

**PCT** WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



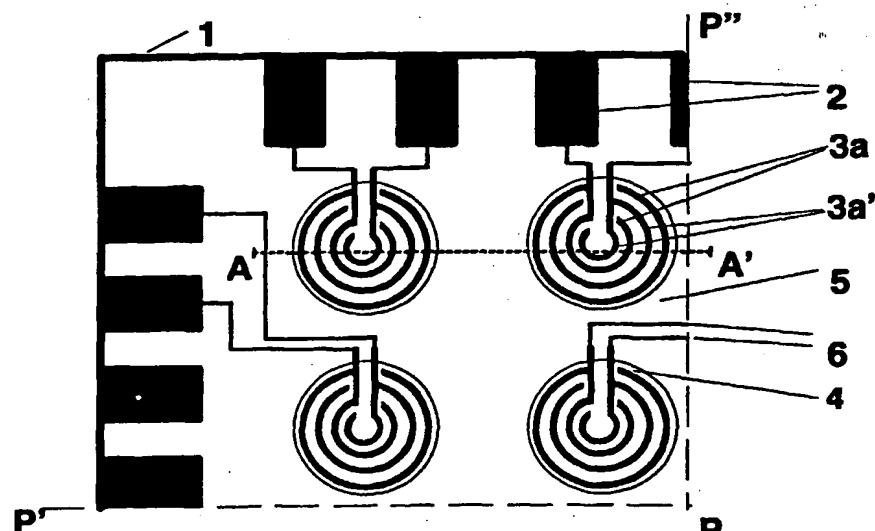
|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :  |  | A1   | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/62047                 |
| G01N 27/403  |  |  | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Oktober 2000 (19.10.00) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04883  |  | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |  |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 12. Juli 1999 (12.07.99)  |  | Veröffentlicht<br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  |  |
| (30) Prioritätsdaten:<br>199 16 921.7 14. April 1999 (14.04.99) DE   |  |  |  |
| (71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 68, D-80636 München (DE).   |  |  |  |
| (72) Erfinder; und   |  |  |  |
| (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): ALBERS, Jörg [DE/DE]; Dorfstrasse 28H, D-25576 Brokdorf (DE). BERNT, Helmut [DE/DE]; Oppelner Strasse 40, D-10997 Berlin (DE). BREDEHORST, Reinhard [DE/DE]; Eichenstrasse 55, D-20255 Hamburg (DE). HINTSCHE, Rainer [DE/DE]; Gravensteinstrasse 61C, D-13127 Berlin (DE). SEITZ, René [DE/DE]; Edendorfer Strasse 174, D-25524 Itzehoe (DE). |  |  |  |
| (74) Anwalt: LEONHARD, Reimund Leonhard, Olgemöller, Fricke; Postfach 10 09 57, D-80083 München (DE).  |  |  |  |

(54) Title: ELECTRIC SENSOR ARRAY

(54) Bezeichnung: ELEKTRISCHES SENSORARRAY

(57) Abstract

The invention relates to an electric sensor array with sub- $\mu\text{m}$  size ultra-micro electrodes, which is used for electrochemical detection in biomolecular assays. According to the invention the same electrode array is suitable for both electrochemical measurements and the application of electric fields for the manipulation of charged molecules. Each array position can be individually addressed and electrochemically controlled and is suitable for individual electric read-out and optional intermediate storage. For biomolecular assays affinity-binding molecules are immobilized in each sensor position on or between the electrodes or on auxiliary surfaces.



## (57) Zusammenfassung

Das elektrische Sensorarray mit Ultramikroelektroden in sub-um-Dimensionen wird zur elektrochemischen Detektion biomolekularer Assays benutzt. Die gleiche Elektrodenanordnung erlaubt erfahrungsgemäss sowohl elektrochemische Messvorgänge als auch die Applikation elektrischer Felder zur Handhabung geladener Moleküle. Jede Arrayposition ist individuell adressierbar, elektrochemisch kontrollierbar und für individuelle elektrische Auslesung sowie wahlweise Zwischenspeicherung geeignet. Für biomolekulare Assays werden affinitätsbindende Moleküle an jeder Sensorposition auf oder zwischen den Elektroden oder auf Hilfsflächen immobilisiert.

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |   |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho   | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen   | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland  | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidschan                | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco  | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      | ML | Mali  | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | MN | Mongolei  | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MR | Mauretanien                                     | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MW | Malawi  | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MX | Mexiko  | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | NE | Niger   | UZ | Usbekistan                     |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NL | Niederlande                                     | VN | Vietnam                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NO | Norwegen  | YU | Jugoslawien                    |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NZ | Neuseeland                                      | ZW | Zimbabwe                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen   |    |                                |
| CM | Kamerun                      |    |                                   | PT | Portugal  |    |                                |
| CN | China                        | KR | Republik Korea                    | RO | Rumänien  |    |                                |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                        | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                         | SD | Sudan   |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein                     | SE | Schweden  |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LK | Sri Lanka                         | SG | Singapur  |    |                                |
| EE | Estland                      | LR | Liberia                           |    |   |    |                                |

WO 00/62047

CT/EP99/04883

1

### Elektrisches Sensorarray

#### Gebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein elektrisches Sensorarray, das aus multiplen Ultramikroelektroden als elektrochemischen Transduktoren besteht und zum gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen Molekülen aus Substanzgemischen in der biochemischen Analytik der medizinischen Diagnostik und der Umweltüberwachung als Teil von Meßanordnungen verwendet wird. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung des analytischen Prozesses.

#### Grundlagen der Erfindung:

Für die analytische Untersuchung biochemischer Assays ist es erwünscht, mehrere Analyte gleichzeitig in sogenannten Arrayanordnungen zu detektieren. Solche Arrays sind auf der Basis optischer Detektion weit verbreitet. Es wäre von Vorteil, direkt elektrische Meßsignale ohne Umweg über optische Detektionshilfen zu erfassen und auf diese Weise partikeltolerant und volumenunabhängig zu messen. Die elektrische Detektion würde Preisvorteile und robustere Handhabung ermöglichen.

Ausgehend vom klassischen Elektrodensystem zur elektrochemischen Detektion gibt es umfangreiche Bemühungen, Elektroden zu miniaturisieren. Mit dem Begriff Ultramikroelektroden bezeichnet man üblicherweise elektrochemisch genutzte Elektrodenstrukturen in Dimensionen unter 5 µm. R.M. Wightman und D.O. Dipf beschreiben Möglichkeiten der Voltammetrie an Ultramikroelektroden in *Electroanalytical Chemistry*, Ed.A.J. Bard (Marcel Dekker, New York 1988)

WO 00/62047

CT/EP99/04883

2

Vol.15, p.267.

Ein Überblick über die Elektrochemie an Ultramikro-elektroden ist zu finden in Physical Electrochemistry, Ed. Rubinstein, Marcel Dekker, 1995 New York, p. 131-208.

Solche Ultramikroelektroden in paarweisen Anordnung ermöglichen auch besondere Detektionsverfahren wie das Redox-Recycling [O. Niwa et al., *Electroanalysis* 3(1991) 163-168], das besonders für biochemische Affinitätsassays mit Enzymmarkierung, wie sie bei Immuno- und DNA-Assays üblich sind, vorteilhaft eingesetzt werden kann. Elektrodenstrukturen unter 300nm Strukturbreiten ermöglichen die markerfreie Detektion der Affinitätsbindung großer Moleküle an elektrodengebundene Fängermoleküle mittels der Impedanzspektroskopie [DE 19610115].

Ein Paar planarer Interdigitalelektroden für konduktometrische und voltametrische Messungen bezeichnen Sheppard et al. in *Anal. Chem.*, 65(1993) 1202 als Array.

Ein Paar interdigitaler Ultramikroelektroden in Siliziumtechnologie verwendeten auch Aoki et al. [*J. Elektroanal. chem.*, 79 (1997) 49] für reversible Redoxreaktionen.

Wiederum ein einzelnes interdigitales Elektrodenpaar wurde von H.T. Tang et al. [*Anal. Chimica Acta*, 214(1988) 187] als Detektorsystem für ein Immunoassay, bestehend aus einem Antigen und einem Antikörper genutzt.

Alle diese Anordnungen wurden aber nur zur Einzelanalytbestimmung beschrieben, so daß arraytypische unterschiedliche Molekülspesies nicht einzelnen elektrisch detektiert werden konnten.

Mikroelektrodenarrays mit 16 parallelen Bandelektroden und

WO 00/62047

CT/EP99/04883

0,1 mm Elektrodenbreite wurden von Aoki et al. Anal. Chem. 64 (1992) 44 zur elektrochemischen Detektion beschrieben. Dabei werden unterschiedliche Polarisationsspannungen an den einzelnen Bandelektroden angelegt und konstant gehalten. Die Elektroden werden seriell im msec-Takt ausgelesen, ohne daß den Einzelelektronen Schalter zugeordnet sind. Ein Tiefpaßfilter verhindert das Auftreten von Ladeströmen. Diese Anordnung ermöglicht nur die Detektion einzelner oder verschiedener elektrodenaktiver Spezies in Lösung.

Eine Weiterentwicklung interdigitaler Elektrodenpaare zu einem Array mit multiplen interdigitalen Elektroden wurden in DE 4318519 zum simultanen Betrieb an einem Multipotentiostaten angegeben. Bei diesem Verfahren werden die Potentiale an den Elektroden individuell kontrolliert und konstant gehalten. Das Array ist auch nur zur simultanen und parallelen Messung eines Analyten in Lösung geeignet. Ebenfalls mit einem Multipotentiostaten wurden 4 Felder mit punktförmigen Mikroelektroden parallel zur Bestimmung verschiedener Metalle mittels anodischem Strippingverfahren beschrieben (DE 4424355C2). Das Verfahren erlaubt nur die spezielle Stripping-Voltammetrie als Detektionsverfahren, wobei mit Hilfe der Square-wave-Voltammetrie Spannungsrampen aufmoduliert wurden.

Das Prinzip einer voltametrischen parallelen Multikanal-messung an Mikroelektrodenarrays ist in Elektroanalysis 8, 10 (1996) 891, aufgezeigt. Ein Elektrodenarray mit 1 bis 2 µm großen Querschnitten von eingebetteten Kohlefasern benutzten T.G. Strein und A.G. Ewing [Analytical Chemistry 65 (1993) 1203]. Beide Verfahren gestatten keine serielle elektrische Abfrage verschiedener Sensorpositionen.

Yon Hin et al. [Sensors and Actuators B1(1990)550] beschreiben ein Multianalytarray bestehend aus zwei

WO 00/62047

CT/EP99/04883

4

mäanderförmigen parallelen Elektrodenbändern zur parallelen Analyse von Glukose und Galaktose mittels Leitfähigkeitsmessung. Dazu wurden Glukoseoxidase und Galactosidase in leitfähigem Polypyrol auf den Elektrodenoberflächen einpolymerisiert, gesteuert durch die Elektropolymerisation. Da dieses Array die elektrische Leitfähigkeit als Detektionsgröße nutzt, sind Schaltvorgänge im Hinblick auf Störungen bei der Voltammetrie ohne Bedeutung.

Ein nanostrukturiertes Goldelektrodenarray zur Immunodetektion wird von C. R. Musiel et al. [Journal of Vacuum Science and Technology B13 (6)(1995)2781] beschrieben. Dieses Elektrodenarray ist durch das Herauslösen von Nanopartikeln aus einer auf Gold aufgebrachten Isolationschicht stochastisch verteilt und kann nicht individuell adressiert und ausgelesen werden.

Im US Patent 5,605,662 ist ein Elektrodenarray individuell ansteuerbarer Einzelelektroden mit ca. 30µm Durchmesser und davon separierten größeren Gegenelektroden auf einem Siliziumchip angegeben. Dieses Array wird nicht zur elektrochemischen Detektion, sondern nur zur Adressierung und Felderzeugung zwischen gelbeschichteten Einzelelektroden und den am Rande dieses Arrays angeordneten Gegenelektroden benutzt. Mit dem erzeugten Feld werden geladene Moleküle auf individuelle Elektrodenpositionen transportiert oder durch entgegengesetzte Polarisation von diesen Feldern entfernt. Für einen konkreten Fall ist dies für das Anreichern von DNA im Gel über individuellen Elektroden zur DNA-Hybridisierung an Fängern und im umgekehrten Fall das Beseitigen von Mismatches durch Feldunterstützung der DNA-Stringenzbehandlung beschrieben [R.G.Sosnowski et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, '94 1997)1119]. Die Anwendung dieses Systems zur molekularbiologischen Multianalyt-diagnostik ist in US 5,5632,957 beschrieben, wobei der elektrische Transport mit optischer Detektion gekoppelt

WO 00/62047

PCT/EP99/04883

5

ist.

Ein Array zur potentiometrischen Anwendung mit mehr als tausend individuell adressierbaren Elektrodenelementen wird von T. Hermes et al. in Sensors and Actuators B 21(1994) 33 beschrieben. Die Einzelpositionen dieses Sensorarrays werden nur zum Zeitpunkt der Auslesung aktiv angeschaltet, während im Nichtlesezustand keine Spannung anliegt und keine Reaktion stattfindet. CMOS-Schalter für dieses An- und Ausschalten der Elektroden sind an jeder Arrayposition individuell angeordnet. Ein analog aufgebautes Multielektrodenarray mit nMOS-Schaltern an jeder Sensorposition wurde von [Fiaccabrono G. C. et al. Sensors and Actuators B, 18 - 19 (1994) 675 beschrieben. Bei dieser Art von Arrays entstehen beträchtliche Ladeströme, die amperometrische Detektionsverfahren stark beeinträchtigen. Ein Array von 19 Iridiumelektroden mit 10 µm Durchmesser als einzeln adressierbare Elektroden beschreiben S.P. Kounaves et al. in Anal. Chem. 66(1994) 418. Die Elektroden wurden seriell in 2-Elektrodentechnik ausgelesen und nur im Lesezustand mit einem Potential belegt.

Die Applikation eines Paares von 20 - 300 nm-strukturierten Interdigitalelektrodenarrays zur markerfreien Impedanzanalyse einer Molekülkonjugation auf den Elektrodenoberflächen wurde im Patent DE 19610115 A1 beschrieben. Ein einzelnes Paar nanostrukturierter Interdigitalelektroden für die Admittanzspektroskopie gelöster Moleküle wurde in J. Vac. Sci. Technol. A 13 (3) (1995) 1755 beschrieben. Das analoge Prinzip der Impedanzmessung im Elektrodenzwischenraum immobilisierter Moleküle mittels eines interdigitalen Paares schattenartig an eine Grubenwand gedampfter Nanometer-elektroden ist in der Patentanmeldung PCT/EP 96/05290 gezeigt. Bei allen beschriebenen Impedanzmessungen mit Ultramikroelektroden wurde ein einzelnes interdigitales Elektrodenpaar in Zweipol-Technik an ein kommerzielles

WO 00/62047

PCT/EP99/04883

6

Impedanzmeßgerät angeschlossen.

Eine besondere Form individuell adressierbarer sub- $\mu\text{m}$ -Bandelektrodenarrays sind von M. P. Nagale und I. Fritsch in Analytical Chemistry 70,14 (1998) 2902 als gestapelte, voneinander isolierte Dünnschichtelektroden beschrieben. Dabei sind die Querschnitte der Stapel als aktive Elektroden verwendet worden. Zur elektrochemischen Kontrolle wurde ein kommerzieller computergestützter Potentiostat mit Arbeits-, Referenz- und GegenElektrode verwendet. Die Auslesung der 15 Elektrodenschichten erfolgte seriell durch An- und Ausschalten.

Ein Mikroelektrodenarray zur extrazellulären Aktivitätsmessung und Stimulation lebender Zellen und neuronaler Gewebe benutzt individuell adressierbare Mikroelektroden von 14  $\mu\text{m}$  im Durchmesser, die mittels eines CMOS VLSI-Chips zur Stimulation und zur Detektion eingesetzt werden, wobei jede ChipElektrode zellulär erzeugte Biopotentiale zwischen 0,9 - 2,1 mV und 100 - 400  $\mu\text{V}$  individuell erfassen kann [J.J. Pancrazio et al. Biosensors & Bioelectronics 13(1998) 971]. Zur Stimulation werden Frequenzen zwischen 0,7 und 50 kHz mit Biasspannungen von 12 - 16  $\mu\text{V}$  appliziert. Die Elektroden werden seriell im Ein- oder Auszustand ausgelesen.

Ein Verfahren und Vorrichtung zur Anreicherung und Aufreinigung von Molekülen an großflächigen Elektroden wird im Patent PCT/DE 97/01368 beschrieben. Dabei werden nur geringe Feldstärken erzeugt und keinerlei Detektionsverfahren einbezogen.

Die Modifizierung und Belegung der Oberflächen mit Biomolekülen, wie sie für das elektrische Sensorarray benutzt werden, wird durch allgemein übliche kovalente Bindung oder Adhäsion an die metallischen oder nichtmetallischen

WO 00/62047

CT/EP99/04883

7

Oberflächen oder an die Wandungen von Kompartments erreicht. Die Moleküle werden dabei als Monolayer oder Multilayer durch kovalente Anbindung, durch Adsorption, durch Einlagerung in Polymere oder als adhäsive Filme aufgebracht [C.F. Mandenius et al., Methods in Enzymology 137(1988) 388]. Weit verbreitet ist die Haftsichterzeugung auf Oberflächen mit funktionalisierten Silanen als Monoschichten [C. M. Fischer et al., Europhysics Letters 28 (2) (1994) 129 - 134] über gasförmig oder in flüssiger Phase aufgebrachte quervernetzte Schichten [R.A. Williams et al. Biosensors & Bioelectronics 9(1994) 159]. An diese Silanderivate, die Amino-, Thiol-, Aldehyd-, Hydroxyl-, Carboxyl- oder andere funktionelle Gruppen tragen können, werden meist mit Hilfe von Crosslinking-Techniken [H.G. Bäumert and H. Fasold, Methods in Enzymology, Vol. 172, p. 584] verschiedenste andere Verbindungen mit passenden reaktiven Gruppen kovalent gebunden. Auf diese Weise sind alle als affinitätsbindende Fängermoleküle geeigneten bioaktiven Substanzen wie Oligonukleotide, Peptide, Haptene und andere auf den Elektrodenflächen zu immobilisieren.

Eine spezifisch die Metallocberflächen nutzende Immobilisierung ist die Ausbildung von Self-assembling-monoschichten durch Thiol/Goldbindungen. Nach Ausbildung der Self-assembling-monoschicht wird z.B. über Streptavidin/Biotin-Kopplungen die geordnete Anbindung von Proteinen wie Antikörpern erreicht [J. Spinke et al., Langmuir 9 (1993) 1821]. In einem anderen Ansatz werden auf Goldflächen über Chelator-thioalkane, histidinmarkierte Proteine geordnet an die Oberflächen gebunden [D. Kröger et al., Biosensors and Bioelectronics 14 (1999) 155].

Eine weitere Methode zur selektiven Aufbringung organischer Haft- und Kopplungsschichten ist die Elektropolymerisation, beispielsweise für die Bindung von Ferrocenen auf Platin-

WO 00/62047

CT/EP99/04883

— elektroden [G.N. Kamau et al. in Anal. Chem. 66(1994) 994].

Für die Positionierung von Substanzen auf biomolekulare Arrays in Mikrodimensionen sind eine Reihe von Verfahren gebräuchlich. Vom makroskopischen Auftupfen ist das Aufsetzen miniaturisierter Ringe auf Chipoberflächen abgeleitet, auf die vorher Filme entsprechender Moleküle durch Tauchen aufgebracht wurden [S.D. Rose, J. Ass. Lab. Autom. 3, 3(1998) 53].

Das piezoelektrische Drucken, analog den Tintenstrahldruckern, zum Aufbau von DNA-Chips gelang A.P. Blanchard [Genetic Engineering, Principles and Methods, 20(1998) 111].

Das sogenannte Mikrokontaktdrucken, d.h. das Übertragen von Molekülen mittels Mikrostempel wurde von A. Kumar und G.M. Whitesides [Appl. Phys. Lett. 63(1993) 2002] beschrieben.

Eine mit photolithgraphischen Masken unterstützte Festphasensynthese auf Chip-Mikroarrealen, die Nucleotidaufbau mittels Photoaktivierung erlaubt, beschreiben G. McGall et al. [Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93(1996) 13555].

Durch elektrochemische Fokussierung werden nach US 5605662 geladene Moleküle aus der Lösung zu ihren Bindungsplätzen in Gelen über Elektroden transportiert.

Durch perforierte Membranen, die auf Chipoberflächen aufgedrückt werden, sind an den offenen Stellen Immobilisierungsreaktionen an den Oberflächen in flüssiger Phase möglich [E. Ermantraut et al., Proc. of μTAS'98, Alberta, Can., 1998, p. 217].

Die aufgezeigten Verfahren stehen für Standardmethoden, die es erlauben, DNA, Oligonukleotide, Proteine und andere

WO 00/62047

CT/EP99/04883

9

Moleküle auf Arraypositionen zu immobilisieren.

Nachteil aller bisher beschriebenen elektrischen Sensorarray-Anordnungen mit Ultramikroelektroden als Transducer ist es, daß sie nur zur Monoanalytbestimmung geeignet sind, oder daß die eigentliche sensorische Funktion von zusätzlichen optischen Komponenten übernommen werden muß. Die bisher als Array bezeichneten Elektroden-Systeme, z.B. Interdigitalelektroden, stellen keine Arrays im eigentlichen Sinn dar, die zur Multianalytmessung geeignet sind. Bisher ist zudem nicht bekannt, wie man Elektrodenarrays mit den in der Computertechnik üblichen seriellen Verfahren, d. h. nacheinander, auslesen kann, ohne daß dabei die elektrische Doppelschicht, die sich durch Polarisation an den Elektroden bei voltammetrischen Detektionsverfahren aufbaut, gestört wird.

Zur Verbesserung dieser Situation ist also eine Arrayanordnung zur Multianalytmessung notwendig, die eine rein elektrische Sensorfunktionen ermöglicht und die mit elektrischen Steuer- und Meßverfahren ausgeführt werden kann.

#### Aufgabe der Erfindung:

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es insbesondere, ein Sensorarray für biochemische Affinitätsassays zur Verfügung zu stellen, das mit den Methoden der Halbleitertechnologie gefertigt werden kann und als elektrochemischer Transducer meßtechnisch einfache elektrische Signale direkt und ohne optische Komponenten erzeugt. Weiterhin soll ein Meßverfahren zur Verfügung gestellt werden, mit dem aus Stoffgemischen unterschiedliche Analyte gleichzeitig bestimmt werden. Aufgabe ist es weiterhin, ein Verfahren zur seriellen elektrischen Auslesung eines elektrischen

WO 00/62047

CT/EP99/04883

10

Sensorarrays zur Verfügung zu stellen, das Störungen des elektrischen Meßprozesses vermeidet und technologisch kompatibel zu den Methoden der Computertechnologie ist. Es sollen Miniaturisierungs-, Fertigungs- und Handhabungsvorteile realisiert sowie die verbesserte analytische Handhabung molekularbiologischer Assays aufgezeigt werden.

#### Erfindungsbeschreibung:

Die Erfindung bezieht sich zum einen darauf, daß als sensorisches Element multiple Ultramikroelektroden, d.h. vorzugsweise Elektroden mit typischen Strukturdimensionen unter 1µm verwendet und als Array angeordnet werden. Die Anordnung der Ultramikroelektroden im Array zielt neben der Miniaturisierung auf ein vorteilhaftes Diffusionsverhalten der zu detektierenden Moleküle und weiterhin auf die Nutzung voltametrischer und impedimetrischer Detektionsverfahren, wie Redox-Recycling und markerfreie Impedanzmessungen, für die derartige Ultramikroelektroden Voraussetzung sind. Die Erfindung bezieht sich ferner auf ein spezielles serielles Auslesungsverfahren der elektrochemischen Prozesse an den Ultramikroelektrodenarrays. Die erfindungsgemäße Ultramikroelektrodenanordnung bezieht sich gleichermaßen auf die Erzeugung multipler elektrischer Felder mit sehr hohen Feldstärken, die zum aktiven Transport von Molekülen individuell an allen Arraypositionen geeignet sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein elektrisches Sensorarray für die Multianalyt-Messung biochemischer molekularer Assays, welches folgendes umfaßt:

- (a) ein mechanisch stabiles planares Substrat, auf dem als Array mehrere Sensorpositionen, die jeweils aus lokal separierten, mindestens paarweisen Ultramikroelektroden

WO 00/62047

CT/EP99/04883

11

und wahlweise zusätzlichen Hilfselektroden bestehen,

- (b) isolierten Leitungen, die eine individuelle elektrische Adressierung jeder Sensorposition und Einzelelektrode gestatten,
- (c) zusätzlichen elektrischen Leitungen, die eine elektrochemische Kontrolle und Steuerung an jeder Position, und wahlweise die Erzeugung elektrischer Gleich- und/oder Wechselfelder an jeder Sensorposition ermöglichen,
- (d) die Immobilisierung unterschiedlicher oder gleicher affinitätsbindender Moleküle, die entweder auf allen oder ausgewählten Oberflächen der einzelnen Sensorpositionen direkt oder an partikulären Trägern oder gelartigen Substanzen gebunden oder eingeschlossen sind und die individuell an oder über den einzelnen Sensorpositionen angeordnet werden,
- (e) integrierte elektronische Funktionselemente, die die individuelle Kontrolle elektrochemischer Reaktionen an den einzelnen Sensorpositionen und unabhängig davon die individuelle elektrische Messung dieser Reaktionen an jeder Position gestatten, wobei die elektronischen Schaltelemente Gruppen, Reihen oder Einzelpositionen der Sensorarrays zugeordnet sind.

Die Erfindung ermöglicht durch diese aktiven Schaltelemente eine serielle, d.h. nacheinander erfolgende, elektrische Auslesung der elektrochemischen Prozesse an einzelnen Sensorpositionen. Die aktiven Schalt-, Steuer- und Auslesefunktionen an jeder Arrayposition werden so ausgeführt, daß die elektrische Doppelschicht, die sich bei elektrochemischen Prozessen an Elektroden ausbildet, nicht gestört wird. Intelligente elektronische Funktionselemente als

WO 00/62047

CT/EP99/04883

12

separate Bauelemente oder direkt an den einzelnen Sensorarraypositionen ermöglichen es außerdem, elektro-chemische Prozesse an einer Sensorposition in den Zeiten zwischen den Auslesungen aufzuzeichnen und zwischenspeichern.

Mit der Erfindung wird ein elektrisches Sensorarray zur Verfügung gestellt, das durch die variable Anzahl spezifischer Sensorarraypositionen für unterschiedliche Analyte erlaubt, unterschiedliche analytische Fragestellungen zu lösen. Darüber wird erfindungsgemäß ein Verfahren aufgezeigt, das es ermöglicht, mit den zur Detektion verwendeten Ultramikroelektroden partikeltolerant, d.h. unabhängig von optischen Eigenschaften in sub- $\mu$ l-Volumina pro Arrayposition zu messen.

Von Vorteil ist weiterhin die Herstellung des Sensorelements mit waferorientierten Technologien der Halbleiter-industrie, die auch kompatibel zu den Verfahren für die Immobilisierung bzw. Beladung von biochemischen affinitäts-bindenden Erkennungsmolekülen auf den Arraypositionen sind.

Eine besondere erfindungsgemäße Variabilität der Anordnungen und Verfahren wird im einzelnen durch die folgenden Maßnahmen erreicht:

- Bei weniger als ca. 50 elektrischen Sensorpositionen im Array werden die Ultramikroelektroden durch direkte metallische Leiterbahnen unter einer Isolationsschicht zu Kontaktflächen geleitet. Als planare Substrate finden für diese Applikation Silizium, Glas, Keramik oder Polymere vorteilhafte Verwendung.
- Sowohl geringe als auch große Zahlen von Sensorpositionen pro Array werden durch Integration der Ableitungen mittels Si-Chip-Technologie realisiert. Silizium als

WO 00/62047

CT/EP99/04883

13

planares Trägerelement wird insbesondere auch dann verwendet, wenn eine größtmöglich dichte Anordnung von einzelnen Sensorelementen bzw. Positionen erreicht werden soll.

- Als Träger für das elektrische Sensorarray wird Silizium auch verwendet, weil es die Anwendung einer effizienten Technologie gestattet und insbesondere dann unabdingbar ist, wenn zur individuellen Kontrolle der Positionen des Sensorarrays Steuerung und Schaltung sowie Auslesung der einzelnen Positionen zusätzliche elektronische Elemente wie Transistoren, Dioden, Widerstände und andere übliche elektronische Komponenten positionsbezogen integriert werden.
- Sowohl bei den elektrischen Sensorelementen mit direkter Kontaktierung als auch bei jenen mit integrierten elektronischen Elementen an den individuellen Sensorpositionen wird erfindungsgemäß ein neues Verfahren zur unabhängigen Kontrolle und seriellen elektrochemischen Detektion an den Sensorpositionen benutzt. Für die elektrochemische Detektion werden dazu durch Elektrodenpolarisation erzeugte elektrische Doppelschichten an den Elektrodenoberflächen kontinuierlich an alle Sensorarraypositionen appliziert. Erreicht wird dies durch besondere Umschalter, die verhindern, daß durch serielle, d. h. nacheinander erfolgende elektrische Auslesung der einzelnen Arraypositionen, diese Polarisation gestört wird und keine sogenannten Umladungsprozesse auftreten.
- Ein besonderer Nutzen entsteht dadurch, daß die zur Detektion verwendeten Ultramikroelektroden und wahlfweise weitere Hilfselektroden gleichzeitig sowohl als Elemente zur Ausführung elektrophoretischer Transportvorgänge der Analytmoleküle zu den Orten affinitäts-

WO 00/62047

CT/EP99/04883

14

bindender Partnermoleküle als auch zur Beseitigung unerwünschter Bindungsereignisse eingesetzt werden.

Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt ein Array mit interdigitalen Ultramikroelektroden mit paarweisen Mikroelektroden und Details einzelner Sensorpositionen;

Fig. 2 zeigt Anordnungen und Kombinationen verschiedener Formen von Ultramikroelektroden und Hilfselektroden einer einzelnen Arrayposition;

Fig. 3 zeigt ein Schema eines Arrays von Paaren interdigitaler Ultramikroelektroden mit aktiven CMOS-Schaltlementen zur Addressierung und Kontrolle der individuellen Elektrodenpolarisation sowie externen Lese- und Meßverstärkern;

Fig. 4 zeigt ein Schema eines Arrays von Paaren interdigitaler Ultramikroelektroden mit aktiven CMOS-Schaltlementen zur Addressierung und Kontrolle der individuellen Elektrodenpolarisation sowie externen Lese- und Meßverstärkern, mit Kontrollverstärker, Lese- und Steuereinrichtungen an jeder Arrayposition; und

Fig. 5 zeigt ein Schema der Anordnung von Arrayelektroden und integrierten-CMOS-Elementen.

Numerierung der Abbildungen

- 1 planarer Träger
- 1s Siliziumsubstrat

WO 00/62047

CT/EP99/04883

15

- 2 Kontaktflächen  
3a ringförmiges Ultramikroelektrodensystem  
3a' ringförmiges Ultramikroelektrodensystem  
3b Hilfselektrode  
3c Hilfselektrode  
3, 3' interdigitales Ultramikroelektrodenpaar  
3d, 3d' interdigitales Elektrodenpaar  
3e, 3e' Hilfselektrodenpaar  
3f, 3f' Ultramikroelektrodenarray  
3g, 3g' Interdigitalelektrodenpaar mit Ultramikroelektrodenarray  
3h, 3h' Elektrodenpaar mit Ultramikroelektrodenarrays  
3i, 3i' mäanderförmige Ultramikroelektroden  
3j Hilfselektrode  
4 Areale der Sensorarraypositionen  
5 Abdeckung der Elektrodenzuleitungen und Steuerleitungen  
6 Metallische Leitungsbahn zu den Elektroden  
7 Siliziumdioxid  
8 Kompartimentmaterial  
9 punktförmige Ultramikroelektroden  
10 elektronische Vorrichtung zur Adressierung und Decodierung  
11 elektronische Vorrichtung mit Leseverstärkern  
12 integrierte Schaltung im adressierten Zustand  
12a Durchkontaktierung  
13 integrierte Schaltung im nicht adressierten Zustand  
13a Durchkontaktierung  
14 aktive Adressleitung A  
15 aktive Adressleitung A'  
16 inaktive Adressleitung B  
17 inaktive Adressleitung B'  
18 Meßleitung C  
19 Meßleitung D  
20 Bias-Leitung E

WO 00/62047

CT/EP99/04883

16

- 21 Bias-Leitung F  
 22 adressierte integrierte Lese-, Verstärker- und Speicherelektronik  
 23 nicht adressierte integrierte Lese-, Verstärker- und Speicherelektronik  
 24 CMOS-Wanne  
 25 Source  
 26 Drain  
 27 CMOS-Aluminium  
 28 CMOS-Dielektrikum  
 29 flüssigkeitsresistente Passivierung  
 30 Goldelektrode  
 31 Polysilizium-gate  
 32 Kreuzung von Adressleitung und Meßleitung

In Figur 1a ist ein Siliziumchip dargestellt, bei dem auf jeder Arrayposition 4 jeweils 1 Paar ringförmiger Mikroelektroden 3a und 3a' angeordnet sind, die durch direkte Leiterbahnen zu elektrischen Kontaktflächen 2 am Rande des Chips verlaufen. In Figur 1b ist eine Detailvergrößerung des Chips in Figur 1a im Schnitt PP' dargestellt. Von jeder Arrayposition 4 werden die Ringelektroden 3a und 3a' zu jeweils einer individuellen Kontaktfläche 2 am Rande des Chips über die Leitungen 6 geführt. Die Leiterbahnen 6 sind dabei von einer flüssigkeitsdichten Isolationsschicht 5 bedeckt, während die aktiven Sensorelemente 3a und 3a' in den Arraypositionen 4 frei bleiben. Die Abdeckung 5 dient auch zur Abgrenzung zwischen den Elektroden der einzelnen Arraypositionen. Ein Querschnittsdetail dieser Abbildung entlang der Schnittlinie A, A' ist in den Figuren 1c und 1d dargestellt. Auf dem Silizium-Substrat 1 ist eine isolierende Schicht aus Siliziumdioxid 7 aufgebracht, die die Elektrodenarrays 3a und sowie die Leiterbahnen 6 als Dünnfilmmetallstrukturen trägt. In Figur 1d ist der analoge Querschnitt AA' dargestellt mit einer zusätzlichen

WO 00/62047

CT/EP99/04883

17

Polymerschicht 8, die zur Ausbildung von Mikrokompartments oder Distanzringen an den Arraypositionen mit den Ringelektroden 3a und 3a' dienen.

In Figur 2 sind einzelne Arraypositionen 4 mit verschiedenen Anordnungen der Ultramikroelektroden und Hilfselektroden dargestellt. Figur 2a zeigt im Detail ein Paar ringförmige Ultramikroelektroden 3a und 3a' mit den Ableitungen 6 auf einer Arrayposition 4. In Figur 2b sind ringförmige Bandelektroden 3a und 3a' sowie 3c angeordnet und zusätzlich eine zentrale kreisförmige Hilfselektrode 3b im Zentrum dieser Bandelektroden. Figur 2c zeigt im Detail ein Paar interdigitaler Ultramikroelektroden 3 und 3' mit den Ableitungen 6 auf der Arrayposition. Figur 2d zeigt 2 Paare interdigitaler Ultramikroelektroden unterschiedlicher Geometrie mit schmalen Elektrodenstrukturen 3 und 3' und vergrößerten Strukturen 3d und 3d' mit individuellen Ableitungen 6. In Figur 2e ist auf der Arrayposition ein interdigitales Ultramikroelektrodenpaar 3 und 3' mit zwei metallischen Hilfselektroden 3e und 3e' angeordnet. Figur 2f zeigt ein Paar interdigitaler Ultramikroelektroden 3 und 3' und zwei flächige Hilfselektroden 3f und 3f' auf die Arrayposition, die von der isolierenden Schicht 5 bedeckt sind. In dieser Abdeckung 5 sind punktförmig aktive Elektrodenflächen 9 freigelegt, die parallel geschaltet sind. In Figur 2g ist ein interdigitales Elektrodenpaar 3g und 3g' mit analogem Aufbau von punktförmigen Elektroden wie für die Elektroden 3f und 3f' dargestellt. Die punktförmigen Elektroden 9 sind entsprechend der Fingerstruktur elektrisch miteinander verbunden. An der Arrayposition nach Figur 2h ist ein Paar flächiger Elektroden 3h und 3h' angeordnet, die ebenfalls von einer Abdeckschicht 5 belegt sind, und Öffnungen mit aktiven punktförmigen Elektroden 9 aufweisen. In Figur 2i ist ein mäanderförmiges Elektrodenpaar 3i und 3i' mit einer flächigen Hilfselektrode 3j kombiniert.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

18

In Figur 3 ist ein Array mit Paaren von interdigitalen Ultramikroelektroden gezeigt, wo Adressierung und Steuerung der Elektrodenpolarisation durch CMOS-Schalter 12, 13 im Siliziumchip 1 an jedem einzelnen Interdigitalsystem 3 und 3' angeordnet sind. Die flüssigkeitsdichte Abdeckung 7 liegt über dieser Schaltalebene. Die Ableitungen 6 in der Ebene der Ultramikroelektroden führen an den Stellen 12a und 13a durch Öffnungen in der isolierenden Abdeckschicht 7 zu der Ebene der CMOS-Schalter. Von einer auf dem Silizium-Chip angeordneten elektronischen Adressiereinheit 10 werden die Adressleitungen 14 und 15 bzw. 16 und 17 angesteuert. Die Schalter 12 zeigen die aktivierte Stellung beim Auslesen einer Spalte von Ultramikroelektroden-Paaren. Die adressierten Ultramikroelektroden sind mit den Meßleitungen 18, 19 verbunden. Die Leitungen 18, 19 führen zu einem Leseverstärker 11. Die Schalter 13 sind in Ruhestellung und die nicht adressierten Ultramikroelektroden sind mit den Bias-Leitungen 20, 21 verbunden.

In Figur 4 ist ein Sensor-Array mit Paaren von interdigitalen Ultramikroelektroden gezeigt, das der Anordnung nach Figur 3 entspricht. Die oval umrandeten Bereiche 22, 23 sind elektronische Schaltungen mit Integratoren als Meßwertspeichern, welche die Stromwerte der benachbarten Ultramikroelektroden 3, 3' speichern. In den Anordnungen 23 wird über die Adressleitungen 16, 17 das Signal zur Durchführung der Integration angelegt und die Ultramikroelektroden mit den Bias-Leitungen 20, 21 verbunden. In den Anordnungen 22 ist durch die Signale der Adressleitungen 14, 15 die Ausgangsspannung des Integrators an die Meßleitungen 18, 19 gelegt.

In Figur 5 ist in Silizium 1s als planarem Träger eine CMOS-Wanne 24 mit Source 25 und Drain 26 integriert. Ein Gate und Leiterbahnen aus Polysilizium 31 verbinden zusamm-

WO 00/62047

CT/EP99/04883

19

men mit CMOS-Aluminium 27 im CMOS-Dielektrikum 28 die chip-internen Elemente. Ebenfalls mittels Aluminium ist die Source 25 mit der Goldelektrode 30 durch eine flüssigkeitsdichte Silizium-nitrid-Passivierung 29 hindurch elektrisch verbunden. Im Kreuzungsbereich 32 kreuzen sich z.B. Leiterbahnen wie die Adressleitungen 15 mit Meßleitung 18 gemäß Figur 4.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

20

### Ausführliche Erfindungsbeschreibung / bevorzugte Anordnungen

Für die Konstruktion des elektrischen Sensorarrays werden planare Träger bzw. Substrate aus verschiedenen Materialien verwendet. Ein besonders günstiges Material ist Silizium, weil mit den eingeführten technologischen Methoden der Halbleiterfertigung die erfindungsgemäßen Ultramikro-elektrodenarrays in Dünnfilmtechnologie und in Waferprozessen hergestellt werden können. Diese Methode ist variabel und preisgünstig, wenn Arraypositionen mit geringer Dichte, d. h. ca. 10 - 30 Arraypositionen pro elektrisches Sensorarray hergestellt werden sollen, so daß wie in Figur 1 dargestellt, die Ultramikroelektroden durch isolierte direkte Kontaktierung mit Kontaktflächen am Rand der Chips verbunden werden.

Wenn zur Ansteuerung der individuellen Positionen des Sensorarrays Steuerung und Schaltung sowie Auslesung der einzelnen Positionen zusätzliche elektronische Elemente wie Transistoren, Diolen, Widerstände und Kondensatoren integriert werden, wie in Figuren 3 und 4 dargestellt, ist die Siliziumtechnologie unerlässlich. Silizium als planares Trägerelement wird insbesondere auch dann verwendet, wenn mehr als ca. 60 Arraypositionen pro Sensorelement oder eine sehr dichte Anordnung dieser Positionen erreicht werden soll.

Im Falle direkter elektrischer Kontaktierung ist die Verwendung von Glas und glasähnlichen Substanzen sowie Keramik und auch den verschiedenen Arten von Polymeren als planare Täger möglich. Alle Substrate müssen dabei die Eigenschaft aufweisen, daß metallische Leiterbahnen und die strukturierten Ultramikroelektroden auf ihnen haftfest aufgebracht werden können. Das halbleitende Silizium wird durch dünne Schichten aus Siliziumdioxid oder Silizium-

WO 00/62047

CT/EP99/04883

21

nitrid oder deren Gemische isoliert. Auf den Einzelpositionen des elektrischen Sensorelements werden die Ultramikroelektroden und bedarfsweise Hilfselektroden oder Hilfsflächen aus Metallen durch Aufdampfen oder Aufsputtern von Edelmetallfilmen wie Gold, Platin oder Iridium aufgebracht und üblicherweise durch photolithographische Prozesse und/oder Naß- bzw. Trockenätzen strukturiert. Mit Hilfe dünner Haftsichten aus Chrom oder Titan oder Tantal oder anderen ähnlichen Metallen wird die Haftung dieser Edelmetalle zum planaren Substrat verbessert. In besonderen Ausführungsformen werden nm-strukturierte Ultramikroelektroden in die Isolatorschichten eingelegt und damit zum Zwecke hoher Chipausbeuten und Kurzschlußfestigkeit planarisiert.

Die für die Detektion verwendeten Ultramikroelektroden, gemäß Figur 2 sind mindestens paarweise angeordnet und können als interdigitale Ringstrukturen 3a, 3a', 3b, 3c, als interdigitale Strukturen verschiedener Geometrien 3, 3', 3d, 3d' 3g, 3g' in einfacher oder mehrfacher Ausführung oder auch als Mäander 3i, 3i' angeordnet sein. Sie können zusammen mit Flächen diskförmiger Ultramikroelektroden sowie auch zusammen mit Hilfselektroden in verschiedenen Kombinationen benutzt werden.

Die bandförmigen Elektrodenstrukturen, die paarweise als kreis- oder spiralförmige oder interdigitale oder mäandrische Anodnungen ausgeführt sind, werden bevorzugt für das Redox-Recycling als Detektionsverfahren benutzt und photolithografisch in Dimensionen zwischen 200 nm und 800 nm gefertigt, sind aber prinzipiell auch sowohl in größeren als auch in kleineren Dimensionen geeignet.

Analoge Elektrodenstrukturen unter 500 nm Strukturbreiten, bevorzugt zwischen 100 und 300 nm, werden zur markerfreien Detektion der Affinitätsbindung großer Moleküle an die

WO 00/62047

CT/EP99/04883

22

elektrodengebundenen Fängermoleküle mittels Impedanzspektroskopie gefertigt.

Eine besondere Eigenschaft der bandförmigen paarweisen Ultramikroelektrodenstrukturen und auch der in großer Nähe angeordneten zusätzlichen Elektroden ist die Erzeugung hoher elektrischer Felder mit Feldstärken bis zu mehreren Megavolt pro m mit relativ geringen Spannungen von typischerweise 0,5 bis 20 V. Die elektrischen Felder zwischen sub- $\mu$ m-Elektroden verlaufen nur in allernächster Nähe der Elektroden und durchdringen damit bevorzugt die aufliegenden Molekülschichten, erfassen aber vergleichsweise wenig von der umgebenden Elektrolytlösung.

Dies wiederum gestattet, einen elektrophoretischen Transport von Molekülen schon mit Spannungen von wenigen Volt und damit einem erheblich niedrigeren Spannungsbedarf als bei den sog. Makroelektroden mit Abmessungen typischerweise über 10  $\mu$ m zu realisieren. Auch durch höhere Spannungen hervorgerufene störende Vorgänge wie Elektrolyse, pH-Gradientenerzeugung u.a. werden auf diese Weise reduziert oder verhindert.

Bei mehrfacher Anordnung paarweiser Ultramikroelektroden, wie in Figur 2b gezeigt, ist eine wahlweise Felderzeugung zwischen den verschiedenen Elektroden möglich. Auch die Möglichkeit von Differenz- oder Brückenschaltungen bei der elektrochemischen Detektion ergibt meßtechnische Vorteile zur Kompensation von Störungen. So sind die in Figur 2d dargestellten zwei Paare interdigitaler Ultramikroelektroden mit unterschiedlichen Geometrien für Differenzschaltungen auf Grund unterschiedlicher Detektionseigenschaften, wie die Amplifikationsrate beim Redoxrecycling, geeignet.

Auch unterschiedliche organische Beladungen erfüllen diesen

WO 00/62047

CT/EP99/04883

23

Zweck einer Differenzmessung. Mittels Abdeckung eines Paars durch galvanische Abscheidung von nicht Self-assembling-monoschichten ausbildenden Metallen, wie z.B. Nickel o.a., wird z.B eine Immobilisierung verhindert. Die metallische Hilfsschicht kann bedarfsweise elektrolytisch wieder entfernt werden. Auch nachträgliche individuelle Entfernung der Immobilisierungsschicht auf einer Elektrode z.B. durch Desorption einer Self-assembling-Schicht mittels elektrischer Oxidation auf einem dieser Elektrodenpaare kann für solche Differenzmessungen genutzt werden.

Die Erzeugung maximal 1 - 2 µm großer punktförmiger Ultramikroelektroden 9 auf den in der übrigen Fläche isolierten Arrays, wie in Figuren 2f, 2g und 2h dargestellt, dient optimaler hemisphärischer Diffusion von elektrodenaktiven Partikeln zu den Elektrodenflächen. Diese hemisphärische Diffusion bewirkt an den punktförmigen Elektroden eine mehr als zehnfach höhere Stromdichte pro Fläche sowohl bei der Detektion als auch bei der Applikation von elektrischen Feldern verglichen mit Makroelektroden.

In einer besonderen Ausführungsform können diese punktförmigen Elektroden wie auch die bandförmigen Elektroden gemäß Figuren 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2h und 2i von einer dünnen Isolatorschicht auf einer oder beiden Elektroden eines Paares bedeckt sein und damit ein besonderes Meßelement zur Kapazitätsmessung immobilisierter oder an die Oberfläche anbindender Moleküle darstellen. Gleichermassen ist durch solche Isolierung eines von zwei Paaren von Ultramikroelektroden eine Differenzmessung möglich.

Die Kombination eines Ultramikroelektrodenpaars mit flächenförmigen Hilfselektroden wie in Figur 2e dargestellt, wird verwendet zur Vergrößerung metallischer Bindungsflächen zur Immobilisierung von Molekülen. Gleichzeitig können diese Flächen wie 3e und 3e', aber auch

WO 00/62047

CT/EP99/04883

24

zur Applikation von elektrischen Zusatzfeldern benutzt werden, um beispielsweise Moleküle in die Nähe der Detektionselektroden 3 und 3' zu transportieren oder bei der Beseitigung von unerwünschten Molekülen Feldunterstützung zu ermöglichen. In Figur 2f ist die Kombination eines interdigitalen Ultramikroelektrodenpaars mit Hilfselektroden 3f, 3f' gezeigt, die mit den beschriebenen punktförmigen Elektroden besetzt sind. Dabei werden die für band- und punktförmige Elektroden vorstehend beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften der Ultramikroelektroden kombiniert.

In einer besonderen Ausführungsform, wie in Figur 2h dargestellt, werden flächenförmige Elektroden mit ultramikroelektrodenförmigen Punkten 9 besonders zur Anwendung für die Impedanzspektroskopie benutzt. Dabei können immobilisierte Moleküle sowohl über den gesamten Elektrodenflächen oder in den Zwischenräumen oder auf den aktiven Elektrodenoberflächen spezifisch gebunden sein. In einer anderen Ausführungsvariante werden die Moleküle auf den dünnen Isolatorschichten, mit denen die Elektroden bedeckt sind immobilisiert.

Weitere Kombination von Elektrodenformen und damit deren Eigenschaften wie z. B. die Doppelanordnung der Elektrodenpaare 3, 3' oder die Kombination von 3a, 3a' mit 3e, 3e' oder 3e, 3e' mit 3g, 3g' und andere sind dabei möglich.

Eine besondere Ausführungsform sind die ringförmigen Ultramikroelektroden 3a, 3a' in Figuren 1, 2a und 2b, die im Prinzip analoge Eigenschaften wie die Paare interdigitaler Mikroelektroden 3 und 3' zeigen, aber effektiver die Ausnutzung der Sensorarrayfläche gestatten und die Applikation zentraler 3b und äußerer Hilfselektroden 3c ermöglichen, die für Feldverteilung und Felderzeugung von Bedeutung sind. Mit letzterer Anordnung lässt sich ein

WO 00/62047

CT/EP99/04883

25

käfigähnliches Feld über z.B. zeitweise inaktiven Elektroden 3a, 3a' erzeugen und gezielt Moleküle in diesen Bereich hereinziehen oder abstoßen.

Die in Figur 2i dargestellten mäanderförmigen Elektroden 3i und 3i' entsprechen in ihren Eigenschaften den ringförmigen- und den interdigitalen Bandelektroden und können ebenso mit den Hilfselektroden 3j für Differenzmessungen oder zur Felderzeugung kombiniert werden,

Eine spezielle, nicht in den Abbildungen dargestellte Form bandförmiger Elektroden ist die spiralförmige Anordnung der Ultramikroelektroden, bei denen parallele Elektrodenbänder von außen nach innen oder von innen nach außen laufen und zu getrennten Kontaktleitungen führen. Auch die spiralförmigen Ultramikroelektroden können wieder mehrfach als Paare mit unterschiedlichen Geometrien kombiniert werden, gegebenenfalls auch mit zusätzlichen Hilfselektroden, entweder flächenförmig oder entsprechend 3b und 3c.

Sowohl die ringförmigen als auch die kreis- und spiralförmigen Ultramikroelektroden können in Analogie zur Figur 2g mit punktförmigen Ultramikroelektroden zusätzlich strukturiert sein und weisen dann auch analoge Eigenschaften auf.

Eine besondere Ausführungsform der Ultramikroelektroden-arrays entsteht nach Anspruch 7 dadurch, daß auf den einzelnen Positionen bandförmige Elektroden, wie in Figuren 2a, 2b, 2c, 2d oder 2i, oder flächenförmige Elektroden analog Figur 2e, mehrfach übereinander gestapelt werden und die dann von isolierenden Zwischenschichten wie Silizium-dioxid, Siliziumnitrit, Siliziumoxinitrit voneinander isoliert sind. Dazu wird das Aufdampfen von Metallen und die PECVD-Abscheidung der typischerweise 2-100 nm dicken Isolatorschichten kombiniert. Diese gestapelten Elektroden sind typischerweise 10 - 200 nm dick und bewirken an den

WO 00/62047

CT/EP99/04883

26

Schnittkanten eines solchen Stapels, der von einem Isolationsmaterial bedeckt ist, ein Ultramikroelektrodenverhalten, wo allerhöchste Annäherung der Elektroden und die Erzeugung ultrahoher Feldstärken erreicht werden. Die einzelnen Schichten werden bei dieser Anordnung individuell unter der isolierenden Bedeckung seitlich zu Kontaktflächen herausgeführt.

Prinzipiell ist es auch möglich, die in Figur 2 gezeigten und vorstehend beschriebenen Ultramikroelektroden und Hilfselektrodenstrukturen mit metallischen Flächen zu kombinieren, die keinen elektrischen Anschluß tragen. Sie dienen dann z.B. als Areale zur Immobilisierung von affinitätsbindenden Molekülen.

Die Ultramikroelektroden einer einzelnen Arrayposition werden mit metallischen Gesamtflächen von typischerweise  $100 - 30\,000 \mu\text{m}^2$  ausgeführt und gestatten es daher, Arraypositionen mit sehr kleinen Abmessungen zu konstruieren, wobei die Abstände der Arraypositionen typischerweise den Abmessungen der aktiven Elektrodenflächen von  $30 \mu\text{m}$  bis  $300 \mu\text{m}$  entsprechen, aber auch wesentlich größer oder kleiner sein können, wenn Applikationen dies erfordern.

Wie in Figur 1d dargestellt, werden für spezielle Anwendungen, dies sind insbesondere quantitative voltammetrische Meßverfahren wie das Redox-recycling, die Arraypositionen durch volumenseparierende Mikrokompartimente voneinander abgetrennt. Im Falle qualitativer Detektion, wie lokale Impedanzspektroskopie an sensorgebundenen Fänger molekülen ist die Volumenseparierung in der Regel nicht erforderlich.

Volumenkompartimentierte Mikroareale werden auch dann benutzt, wenn Reaktionen und Molekülimmobolisierungen auf individuellen Arraypositionen ausgeführt werden sollen.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

27

Falls die Detektion dies erfordert, können diese Kompartimente wahlweise nach ausgeführten Immobilisierungsreaktionen wieder entfernt werden. Damit entsteht ein ideal planares Sensorarray, das homogen sowohl für Analyt- als auch Reagenzlösungen zugänglich ist.

Mittels Stempel-, Piezo- oder Tintenstrahletechnik oder anderen Spottingverfahren, wie Mikrokapillardosierung können die zu immobilisierenden Moleküle ebenfalls auf den Sensorarrayflächen ohne Kompartimentierung lokal positioniert werden.

Die zu immobilisierenden Fänger moleküle selbst werden nach bekannten Verfahren über bifunktionelle Reagenzien z.B. Alkyloxsilane mit verschiedenen funktionellen Gruppen wie Halogen-, Amino-, Thioester- und Aldehydgruppen, Succinimid-, Carbodiimid- und andere gebräuchliche Kopp lingsgruppen [H.G. Bäumert and H. Fasold, Methods in Enzymology, Vol. 172, p. 584] an die Oberflächen der planaren Trägerelemente wie z.B. Siliziumdioxid, Glas, Keramik oder Polymere oder auch an die Wandungen der Si- oder polymeren Mikrokompartimente gebunden.

Eine bevorzugte Immobilisierungsform ist die Nutzung der Gold- und Platinoberfläche als Immobilisierungsareal für Thioderivate von Fänger molekülen, die sog. Selbstorganisierende molekulare Monolayer auf diesen gut definierten Elektrodenoberflächen ausbilden [S.D. Evans et al., J. Amer. Chem. Soc. 113 (1991) 5866].

In einer anderen Ausführungsform werden die im ganzen mit Self-assembling-schichten auf den Elektroden belegten Arraypositionen teilweise wieder gereinigt. Moleküle, die sowohl auf Detektions- als auch Hilfsflächen gemeinsam auf den Metallocberflächen immobilisiert wurden, können durch Applikation elektrischer Felder gezielt von den Detektor-

WO 00/62047

CT/EP99/04883

28

— — — — — elektroden wieder desorbiert werden. Durch elektrische Potentiale wird die Desorption von Thiolen erreicht, so daß die Detektionselektroden frei von Beschichtungen werden. Sie können dann Produkte detektieren, die z.B. auf anderen Flächen der Sensorarrayposition, wie den metallischen Hilfsflächen gebildet werden.

Alternativ zu den vorstehend beschriebenen Immobilisierungen von affinitätsbindenden Molekülen auf den Elektroden oder Hilfselektroden oder metallischen Hilfsflächen bzw. den Wandungen oder anorganischen Teilflächen der einzelnen Sensorareale können diese affinitätsbindenden Moleküle wahlweise auch über den Sensorpositionen angeordnet und dazu an partikulären oder gelartigen Trägern gebunden werden. In dieser Form ist es möglich, die Produkte der Enzymmarker von biochemischen Assays, die an kugelförmigen oder partikelförmigen Polymeren oder metallischen oder mineralischen Partikeln gebunden sind, in den o.g. Mikrokompartmenten anzurufen oder mechanisch, beispielsweise durch Einschluß zu fixieren. Auch die Fixierung magnetischer Trägerpartikel in den Mikrokompartmenten durch Magnete unterhalb der Chips ist geeignet, unterschiedliche Sensorarraypositionen zu beladen.

Auch das Einbringen von Gelen mit inkorporierten affinitätsbindenden Molekülen oder Molekülkomplexen in die Mikrokompartmente oder über die gesamte Sensorfläche ist möglich. Solche Gele können üblicherweise durch Diffusion oder elektrisch unterstützte Diffusion wie bei der Gelelektrophorese mit biochemischen Assays oder Assaykomponenten beladen werden. Durch die Anordnung mehrerer Ultramikroelektroden an jeder Arrayposition ist dies im Gegensatz zu anderen beschriebenen Verfahren an jeder bzw. allen einzelnen Sensorarrayposition unabhängig möglich.

In einer besonderen Ausführungsform werden die an der

WO 00/62047

CT/EP99/04883

29

Arrayoberfläche immobilisierten Moleküle partiell in den Kompartments oder homogen über die gesamte Sensorarrayfläche mit einem permeablen Hydrogel bedeckt. Das Gel wirkt als Schutzschicht oder erleichtert den Molekültransort durch Elektrophorese.

Die Anordnung immobilisierter biochemischer Assays an Partikeln oder in Gelen über den Elektroden wird dadurch möglich, daß Detektionsverfahren wie das Redox-Recycling, die niedermolekularen von den Assays produzierten und an die Elektroden diffundierenden Enzymprodukte messen, solange die Wassereinlagerung in den Gelen oder Zwischenräumen zwischen Partikeln eine Diffusion gestatten. Das Redox-Recycling selbst ist durch die geringen Distanzen zwischen den Ultramikroelektroden dadurch ausgezeichnet, daß aufliegende Partikel oder Gele solche Detektionen nicht stören, da sie vorzugsweise in oder nahe der molekularen Doppelschicht, die durch Polarisation an den Elektrodenoberflächen entsteht, verlaufen. In gleicher Weise ist auch eine impedimetrische Detektion an den Ultramikroelektroden im Gegensatz zu üblichen Verfahren, die weit voneinander entfernte Elektroden nutzen [V.M. Mirsky et al. Biosensors & Bioelectronics 12, 9-10(1997) 977] weitgehend partikelunabhängig. Bei Ultramikroelektroden mit einem Elektrodenabstand von 200 nm und ca. 1 µm langen DNA-Molekülen, die an deren Oberfläche in größter Nähe zueinander affinitätsgebunden sind, verläuft das elektrische Feld zwischen 2 Bandelektroden im wesentlichen durch die Moleküle selbst, wobei weiter entfernte Partikel ebenso wie der Grundelektrolyt in der Lösung wenig Einfluß haben.

Ein besonderes Merkmal der Erfindung ist die individuelle Kontrolle elektrochemischer Prozesse zur Detektion an jeder einzelnen Arrayposition unabhängig in der Weise, daß durch elektrisches Auslesen und damit verbundenes Schalten diese Prozesse nicht gestört werden. Erfindungsgemäß wird dies

WO 00/62047

CT/EP99/04883

30

dadurch erreicht, daß die Elektrodenpolarisation wie sie beispielsweise für das voltammetrische Redox-Recycling benötigt wird, an allen Arraypositionen individuell erzeugt werden muß. Dies ist problemlos durch Multipotentiotasten mit direkten Leiterbahnen zu jeder Chiparrayposition und jeder Einzelelektrode simultan und parallel möglich [R. Hintsche et al. Biosensors & Bioelectronics 9(1994) 697]. Da auf diese Weise die Zahl der möglichen Arraypositionen sehr durch den elektronischen Aufwand beim Meßgerät begrenzt ist und auch durch die Zahl der Leiterbahnen limitiert ist, werden erfundungsgemäß die einzelnen Detektorelektroden seriell, d. h. nacheinander vermessen. Vorbedingung ist dabei, daß die elektrischen Potentiale zur Polarisation für Anode und Kathode beim Redox-Recycling auch dann erhalten bleiben, wenn die Elektroden einzeln nacheinander oder in Gruppen mittels individueller Schalter an das Meßgerät angeschlossen werden.

In der einfachsten Ausführungsform mit direkter Kontaktierung der Elektrodenarraypositionen nach Figur 1 wird dazu ein ASIC benutzt. Bezuglich der Messung hat er die Funktionalität eines Multiplexers, d.h. die individuell mit dem ASIC verbundenen Sensorpositionen werden seriell adressiert und auf einen einzigen Bipotentiotasten zur Auslesung geschaltet. Abweichend von einer einfachen Multiplexerausführung sind jedoch die einzelnen Schalter des Multiplexers nicht als Ein-Aus-Schalter sondern als Umschalter ausgelegt. Im nicht adressierten Zustand verbinden sie die Sensorpositionen mit einer Biasspannung, die der Aufrechterhaltung der Elektrodenpolarisation während des Nichtlesezustands dient.

In einer komplexeren Ausführungsvariante wird die störungsfreie Umschaltung eines größeren Arrays von Sensor-elektroden erfundungsgemäß, wie in Figur 3 dargestellt,

WO 00/62047

CT/EP99/04883

31

dadurch erreicht, daß neben üblichen Adress- und Meßleitungen, wie sie für elektronische Speicher seit langem verwendet werden, zusätzliche potentialführende Leitungen, sogenannte Biasleitungen angeordnet werden. Die Adressierung wird dabei von einem Adressierelement, das außerhalb des eigentlichen elektrischen Sensorarrays entsprechend Detail 10 in Figur 3 angeordnet sein kann, über die Adressleitungen 14/15 und 16/17 ausgeführt werden. Die Meßleitungen 18 und 19 in Figur 3 und die Biasleitungen 20 und 21 werden dabei von speziellen Leseverstärkern 11 ausgelesen, die ebenfalls außerhalb des eigentlichen elektrischen Sensorarrays angeordnet sind. Durch die Meßleitungen 18 werden dabei alle Elektroden 3 auf den unterschiedlichen Sensorarraypositionen erfaßt und gemessen, während die Meßleitung 19 alle Interdigitalelektroden 3' in Figur 3 messen kann. In analoger Weise können alle Elektroden 3 von der Biasleitung 21 mit der gleichen Polarisationsspannung, die z.B. für die Oxidation einer zu detektierenden Molekülart erforderlich ist, versorgt werden. In gleicher Weise können alle Elektroden 3' durch die Biasleitung 20 mit dem Potential für die Elektrodenpolarisierung, das für eine Reduktion notwendig ist, versorgt werden. Die an jeder Sensorposition integrierten Umschalteinrichtungen 12 und 13 bewirken dabei die Umschaltung zwischen Lese- und Nichtlesezustand. Beim Lesezustand wird die ablaufende elektrochemische Reaktion meßtechnisch über die Meßleitungen erfaßt und gleichzeitig mittels des Multipotentiostaten gesteuert. Im Nichtlesezustand werden die elektrochemischen Vorgänge, z.B. Oxidation oder Reduktion, durch die Biasleitungen 21 für 3 und 20 für 3' kontinuierlich mit den Polarisationsspannungen versorgt und kontrolliert. Die Schaltelemente 12 und 13 werden z.B. mit konventioneller CMOS-Technologie mit üblicher Halbleitertechnologie in Siliziumwafern an jeder Arrayposition lokal angeordnet. Über diesen integrierten CMOS-Schaltern, an die Meß-, Bias- und Adressleitungen geführt werden,

WO 00/62047

CT/EP99/04883

32

befindet sich eine flüssigkeitsresistente Isolations-schicht, z.B. aus Siliziumoxinitrit, wahlweise in Kombination mit Siliziumdioxid. Der Kontakt zwischen den Schaltelementen 12 und 13 und den individuellen Elektroden 3 und 3', die in der beschriebenen Dünnfilmtechnologie auf dieser Isolationsschicht durch Elektronenstrahlverdampfen oder Sputtern und ähnliche Prozesse aufgebracht werden, wird durch eine senkrechte Durchkontaktierung zur CMOS-Elementebene im Silizium erzeugt. Alle Strukturen oberhalb dieser flüssigkeitsresistenten Isolationsschicht entsprechen den in Figuren 1 und 2 dargestellten Details mit dem Unterschied, daß die in Figur 1 gezeigte direkte Kontaktierung durch Leiterbahnen entfällt. Die besondere Konstruktion der integrierten CMOS-Schalteinrichtungen 12 und 13 ermöglicht es, das Umschalten vom Lese- in den Nichtleseprozeß für die interdigitalen Ultramikroelektroden ohne Einfluß zu realisieren. Dies ist notwendige Voraussetzung für den gesamten meßtechnischen Prozeß, da sich durch die Elektrodenpolarisation an der Elektrodenoberfläche eine elektrochemische Doppelschicht ausbildet, die als eine Art chemisches Gedächtnis während des Schaltprozesses erhalten bleiben muß.

Der Umschaltprozess dauert nur Mikrosekunden, so daß während dieser Zeit die Elektrodenkapazitäten als Spannungsspeicher wirken. Danach ist die Versorgung der Elektroden mit Polarisationsspannung von den Meßleitungen 18 und 19 auf die Biasleitungen 20 und 21 umgeschaltet.

In Figur 3 stellen die schwarzen Vollkreise 12 diejenigen Schaltelemente dar, die im Lesezustand von den Meßleitungen 18 und 19 mit der Polarisationsspannung versorgt werden und durch diese Leitungen auch mit den Leseverstärkern zur Detektion des elektrochemischen voltametrischen oder impedimetrischen Ereignisses verbunden sind. Die Adressierung vom elektronischen Element 10 erfolgt dabei

WO 00/62047

CT/EP99/04883

33

reihenweise, so daß sich, wie schematisch dargestellt, mehrere Sensorarraypositionen im Lesezustand befinden. Sie können durch das meßtechnische Element mit Leseverstärkern 11 nacheinander, mit einem Leseverstärker oder parallel mit zwei Leseverstärkern ausgelesen werden bzw. der elektrochemische Vorgang verfolgt werden. Die reihenweise Adressierung durch die Adressleitungen 14 und 15 erlaubt eine beliebige Verlängerung dieser Reihe adressierter Arraypositionen und beliebig viele Elemente, die jeweils wieder durch die Meßleitungen nacheinander oder parallel durch Leseverstärker ausgemessen werden können. Nach Beendigung des Meßereignisses an dieser senkrechten mit schwarzen Schaltelementen dargestellten Reihe von Sensorarraypositionen kann die benachbarte senkrechte Reihe mit den bisher inaktiven Schaltelementen 13 durch die beiden Adressleitungen 16 und 17, die jeweils die Elektroden 3 oder 3' ansteuern, in die Meßposition wie vorstehend beschrieben umgeschaltet werden. Dies geschieht, nachdem die vorher in Lesezustand befindliche Reihe auf den Nichtlesezustand umgeschaltet wurde. So fortschreitend kann einzeln oder in Reihen jede Sensorarrayposition wie in der Speichertechnik üblich, adressiert und ausgelesen werden. Diese Meß-, Bias- und Adressleitungen können in der Siliziumebene durch eine sog. Mehrlagenverdrahtung realisiert werden, wie sie in der Siliziumtechnologie für elektronische Bauelemente üblich ist.

In einer anderen spezifischen Ausführungsform, die in Figur 4 schematisch dargestellt ist, werden die elektrischen Sensorarrays zusätzlich neben den CMOS-Schalteinrichtungen 12 und 13 zusätzlich mit weiteren integrierten Elementen zur Auslesung, Verstärkung und gegebenenfalls zur Zwischenspeicherung ausgerüstet. Dabei wird der Lesezustand, wie vorstehend zu Figur 3 beschrieben, in gleicher Weise durch die Adressierleitungen 14 und 15 bestimmt und die übrigen Arraypositionen mit den Adressleitungen 16 und 17 über die

WO 00/62047

CT/EP99/04883

34

Biasleitungen 20 und 21 kontrolliert und durch die Meßleitungen 18 und 19 ausgelesen. In den elektronischen Elementen 22 und 23 in Figur 4 sind an jeder Arrayposition und an jeder individuellen Elektrode 3 und 3' elektronische Verstärker angeordnet. Dabei wird an der Arrayposition direkt das elektrochemische Meßsignal, das durch die Elektrodenprozesse generiert wird, über Vorverstärker verstärkt und kann dann entsprechend Figur 3 über die Meßleitungen 18 und 19 im adressierten Zustand ausgelesen werden. Bei dieser Verfahrensweise sind die nichtadressierten Leseverstärker in den elektronischen Elementen 23 ohne Funktion.

In einer besonderen Ausführungsform werden in die elektronischen Elemente 22 und 23 zusätzlich elektronische Speicher integriert. Da der elektrochemische Prozeß durch die konstant erhaltene Elektrodenpolarisation auch in den Zeiten abläuft, in denen sich Elektrodenarraypositionen im Nichtlesezustand befinden, wird diese Zeit genutzt, um über die Leseverstärker das in den Ultramikroelektroden generierte Signal in einem elektronischen Zwischenspeicher zu akkumulieren und abzuspeichern. Bei dieser Ausführungsform wird das an den Elektroden generierte Signal über Leseverstärker in einen Zwischenspeicher gegeben, der beim Lesevorgang über die Meßleitungen ausgelesen wird. Danach wird beim Lesevorgang das während der gesamten Zeit im Nichtlesezustand im Speicher akkumulierte elektrochemische Ergebnis sehr rasch ausgelesen. Es ist bei dieser Anordnung nicht notwendig, längere Meßzeiten während eines Auslesevorganges in Kauf zu nehmen. Die besondere Konstruktion mit den zusätzlichen Biasleitungen macht diese Art der Meßwertgewinnung und Zwischenspeicherung möglich. Man erreicht auf diese Weise eine erhebliche Beschleunigung des Ausleseprozesses und eine wesentliche Verbesserung des Nutzsignals/pro Zeit verglichen mit der Ausführungsvariante in Figur 3. In der Ausführungsvariante gemäß Figur 4 lassen

WO 00/62047

CT/EP99/04883

35

sich durch die Integration elektronischer Komponenten an den einzelnen Arraypositionen auch elektrische Sensorarrays mit höherer Dichte der Arraypositionen (1000 und mehr) anordnen.

Typisch für die integrierten CMOS-Schalter und elektronischen Zusatzelemente unterhalb der Arraypositionen im Silizium werden Standardtransistoren wie in Figur 5 schematisch gezeigt als CMOS-Wanne 24 mit Source 25 und Drain 26 angeordnet. Gates und Leiterbahnen aus Polysilizium 31 verbinden wie auch CMOS-Aluminium 27 im CMOS-Dielektrikum 28 die chipinternen Elemente. Ebenfalls mittels Aluminium oder auch Wolfram wird die Kontaktierung der chipinternen Elemente mit den Elektroden an den Sensorarraypositionen durch eine flüssigkeitsdichte Siliziumnitrid-Passivierung 29 hindurch erreicht. Der Kreuzungsbereich 32 zeigt exemplarisch, wie sich Leiterbahnen kreuzen, z.B. die Adressleitung 15 mit Meßleitung 18 gemäß Figur 4.

Die vorstehend beschriebenen mit verschiedenen elektronischen Elementen ausgerüsteten elektrischen Sensorarrays eignen sich alle in gleicher Weise für eine Multianalytmessung. Wie vorstehend beschrieben, wird die Immobilisierung unterschiedlicher affinitätsbindender Moleküle auf einzelnen Sensorarraypositionen, z. B. in den Mikrokompartmenten, ausgeführt, indem durch Mikrodosierung beispielsweise tintenstrahlanaloge Dosiertechnik (z.B. Piezodosierer) oder Mikrokapillardosierung die Reaktionslösungen zugeführt werden. Es ist ebenso möglich, durch Stempeltechniken individuell auf einzelne Positionen Moleküle aufzubringen, die dann reagieren oder haften. Beispielsweise werden Selfassembly-Schichten durch sog. Kontaktstempelung vom Stempel auf die Elektrodenoberfläche übertragen und damit individuell über eine Thiol-Goldbindung belegt.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

Bei einer anderen Ausführungsform wird die Immobilisierung durch aufgesetzte Mikrodurchflußsysteme bzw. Stempel für die Applizierung von Flüssigkeiten durch Ein- und Ausflußöffnungen über einzelnen Arraypositionen oder in Gruppen oder in Reihen erreicht. Die so mit unterschiedlichen affinitätsbindenden Molekülen ausgestatteten Arraypositionen aller Ausführungsformen werden dann mit einem Multianalytgemisch in ihrer Gesamtheit in Kontakt gebracht. Dies kann durch Tauchen des Sensorarrays in die Analytlösung oder durch Einbau in eine Durchflußzelle oder durch Befüllen von Kompartimenten an den Einzelpositionen erfolgen. Die unterschiedlichen affinitätsbindenden Moleküle auf oder über den Arraypositionen binden durch ihre hohe Spezifität ausschließlich ihr Zielmolekül, sofern es im Analytgemisch vorhanden ist. Dieser Bindungsprozeß ebenso wie ein analoger Bindungsprozeß an immobilisierten Molekülen in Gelen oder auf Partikeln ist Voraussetzung für den folgenden elektrochemischen Detektionsprozeß. Die Verwendung vonträgergebundenen Fänger molekülen erzielt hohe Beladungsdichten in einer Sensorarrayposition, da nicht nur die Flächen, sondern das Volumen genutzt wird.

Für das Redox-Recycling werden Enzymmarker verwendet, die entweder mit dem Zielmolekül an die Sensorarrayposition eingeführt werden oder nach der erfolgten spezifischen Bindung durch sekundäre Bindungsprozesse wie Antikörperbindung, Interkalation, kovalente Anheftung und andere gebräuchliche Markierungsreaktionen gebunden werden. Die Markerenzyme, die sich nur an Arraypositionen befinden, an denen die molekulare Erkennungsreaktion stattgefunden hat, werden mit einem elektrochemisch inaktiven Substrat z. B. p-Aminophenylphosphat versetzt, das dann durch die Enzymreaktion in ein elektrodenaktives Produkt das p-Aminophenol umgewandelt wird. Im zyklischen Prozess einer an Anode und Kathode der bandförmigen Ultramikroelektroden ablaufenden

WO 00/62047

CT/EP99/04883

37

Oxidation und Reduktion wird ein Summenstrom ermittelt, der mit der Menge der an dieser Arrayposition gebundenen Moleküle streng korreliert. Bezogen auf gebundene Analyt moleküle muß die Menge eingeführten Markerenzyme quantitativ und stöchiometrisch sein. Nutzt man die zur Immobilisierung hergestellten Mikrokompartments auch zur Volumentrennung bei dieser Art Detektion aus, ist die in jedem Mikrokompartiment entstehende Konzentration an elektroaktiven Spezies ein quantitatives Maß für die Zahl der an dieser Arrayposition individuell stattgefundenen Erkennungsreaktionen. Auf diese Weise bedeutet das Fehlen einer elektrochemischen Reaktion auch das Ausbleiben des Erkennungseignisses und damit die Abwesenheit des gesuchten Analyten an der jeweiligen Arrayposition.

Die von den Enzymmarkern für das Redox-Recycling erzeugten elektrodenaktiven Moleküle können problemlos in wasserhaltigen Gelen an die Elektrodenoberfläche diffundieren. Auch aus einer Partikelpackung über dem Elektrodenarray diffundieren sie über die Flüssigkeit zwischen den festen Partikeln, wobei im geringen Restvolumen besonders rasch eine Konzentrationserhöhung herbeigeführt wird.

Da sich der Detektionsprozeß durch das Ultramikroelektrodenverhalten nur unmittelbar an der Elektrodenoberfläche abspielt, ist die bestimmende Zone die Elektrodendoppel schicht und wenige Moleküllagen darüber. Dadurch ist die Methode unabhängig von Konvektion und allein durch die Braun'sche Molekularbewegung bestimmt, so daß jegliches aktives Rühren unterbleiben kann und zum Beispiel mit Stop Flow Verfahren oder geschlossenen Kammern und Mikrokompartments gearbeitet werden kann.

In einer anderen Ausführungsform, wenn die Mikrokom partments nach erfolgter Immobilisierung wieder entfernt wurden, erhält man nur qualitative Aussagen für die An-

WO 00/62047

CT/EP99/04883

oder Abwesenheit von Analyten unter der Bedingung, daß die Konvektion sich bildender Markerenzymprodukte genügend unterdrückt wird, z.B. durch ausreichenden Abstand der Positionen und stopped flow Analytik.

In einer weiteren Ausführungsform werden die planaren Sensorarrays zur Redox-Recycling- Detektion wieder mit volumentrennenden Elementen für die Arraypositionen versehen. Dies kann beispielsweise auch durch das Aufsetzen der vorstehend zur Immobilisierung beschriebenen Stempel erfolgen. Es lassen sich damit Einzelsensoarraypositionen, Gruppen von Arraypositionen oder Reihen von Arraypositionen separat erfassen und messen.

Bei einer anderen Ausführungsform, die die elektrochemische Impedanzspektroskopie als Detektionsmethode verwendet, werden ebenfalls die in Figuren 1, 3 und 4 beschriebenen Anordnungen der elektronischen Schalt- und Zusatzelemente Wechselstrom verwendet. Die Spezifität dieser Meßmethode und der Abstand der Elektroden in den nm-Dimensionen machen es möglich, eine solche Reaktion markerfrei zu vermessen.

Zur Messung werden Wechselströme mit bestimmter Frequenz oder Frequenzgemische von 0,1 Hz - 1MHz auf eine Biasspannung von vorzugsweise 10 - 200 mV aufgeprägt, die in der gleichen Weise wie die Elektrodenpolarisation für die voltametrischen Methoden an die Arraypositionen angelegt wird. Bei dieser Detektionsmethode werden Elektrodenabstände < 500 nm, bevorzugt 20 - 200 nm, verwendet. Wie bei den Ausführungsvarianten für das Redox- Recycling werden die auf oder zwischen den Elektrodenoberflächen in der Sensorarrayposition immobilisierten, affinitätsbindenden Moleküle mit dem Gemisch verschiedener Analyte zusammengebracht und die molekulare Erkennungsreaktion läuft wie voranstehend beschrieben ab. Mit den durch die geringen Elektrodenabständen erzielbaren starken

WO 00/62047

CT/EP99/04883

39

elektrischen Feldern von einigen MV/m kann auf jeder Position individuell vermessen werden, wie die affinitätsbindenden Moleküle die Elektrodenoberfläche bedecken. Dies zeigt sich entsprechend der Bedeckung der Oberflächen durch die Abnahme der Kapazität der Ultramikroelektroden. Erfolg der Immobilisierung und Bedeckungsgrad lassen sich auf diese Weise quantitativ verfolgen. Die mit affinitätsbindenden Fängerelektroden versehenen einzelnen Sensorarraypositionen werden individuell mittels konventioneller Impedanzspektroskopie bei einzelnen Frequenzen oder mit Frequenzgemischen und Fourier-Analyse vermessen, wobei Kapazität, Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante sowie der Phasenwinkel durch die Messung und ihre Auswertung separiert werden können. Nach erfolgter Erkennungsreaktion an einer einzelnen Arrayposition, die üblicherweise mit einem größeren Biomakromolekül erfolgt, bildet sich ein großer Molekülkomplex, der typischerweise größer ist als der Abstand zwischen zwei Elektroden. Das elektrische Feld reicht dabei nicht erheblich über diese Molekülkomplexe hinaus und erfaßt so nur die elektrodennahen Bereiche, so daß schwebende Partikel nicht stören. Impedanzmessung aus vor und nach erfolgten Erkennungsreaktionen mit den gleichen Parametern wird zur Differenzbildung benutzt. Eine sichtbare Veränderung gibt Auskunft darüber, an welchen Positionen Komplexbindungen stattgefunden haben. Die Impedanzänderung wird durch die Verdrängung des Elektrolyten und Beeinflussung des elektrischen Feldes z.B. durch geladene DNA-Moleküle hervorgerufen.

Im Unterschied zum quantitativen Redox-Recycling ist die impedanzspektroskopische Detektionsmethode semiquantitativ und gestattet eine Aussage über stattgefundene oder nicht stattgefundene molekulare Erkennungsreaktionen. Die Parameter, die bei der Impedanzspektroskopie ausgewertet werden, erlauben Aussagen über die Größe der Moleküle, die an der Elektrodenoberfläche bei der Erkennungsreaktion

WO 00/62047

CT/EP99/04883

40

gebunden haben sowie über den Ladungszustand dieses Moleküle. Auch die Dichte der Molekülbelegung hat Einfluß auf das Meßergebnis. Alle Parameter können zur näheren Analyse des molekularen Erkennungsvorgangs und der beteiligten Partner herangezogen werden.

In einer speziellen Ausführungsform wird das elektrische Sensorarray nach Immobilisierung der affinitätsbindenden Moleküle oder nach stattgefunder molekularer Erkennungsreaktion und entsprechender Waschvorgänge mit einem Hydrogel belegt. Diese Belegung mit Hydrogel kann für verschiedene Verfahren zur Anwendung der elektrischen Sensorarrays vorteilhaft sein. Bei der Bedeckung der oberflächengebundenen affinitätsbindenden Moleküle mit Hydrogel können z.B. die Analyte aktiv durch Dosierung oder elektrophoretisch durch Applikation elektrischer Felder mittels Hilfselektroden in das Gel und an die Affinitätspartner herangebracht oder durch Diffusionsprozesse zugeführt werden. Die Beschichtung mit Hydrogelen nach stattgefunder molekularer Erkennungsreaktion an den Oberflächen kann auch dazu verwendet werden, zusätzliche Marker oder Reagenzien durch elektrophoretische Prozesse oder Direktdosierung an die Molekülkomplexe heranzuführen und zu detektieren.

Alternativ werden Hydrogele benutzt, um partikelgebundene immobilisierte Fänger moleküle oder nach stattgefunder molekularer Erkennungsreaktion immobilisierte Zielanalyte in den Mikrokompartmenten einzuschließen. Die Methode ist bevorzugt geeignet für die Anwendung des Redox-Recycling, da die diffundierenden Enzymprodukte durch das Gel wenig gehindert werden, an die Elektrodenoberfläche zu gelangen. Zu beobachten ist dabei lediglich eine Verlangsamung der Diffusion.

In einer anderen Ausführungsform werden die Hydrogele über

WO 00/62047

CT/EP99/04883

41

das gesamte elektrische Sensorarray gleichmäßig aufgebracht und bewirken durch ihre Diffusionshemmung eine verbesserte Zuordnung der Bindungsvorgänge zu einzelnen Arraypositionen, ohne daß Mikrokompartmente hergestellt wurden.

Die an den einzelnen Arraypositionen angeordneten Ultramikrodetektionselektroden und flächenförmigen oder mit Punktelektroden besetzten Hilfselektroden sowie die spiralförmig angeordneten Bandelektroden nach Figur 2 können neben ihrer Verwendung für die Detektionsprozesse selbst auch zur Applikation elektrischer Felder im Sinne einer Freifeld- oder Gelelektrophorese eingesetzt werden. Für die Heranführung geladener Analytmoleküle oder Reagenzien an die Elektrodenoberflächen, z.B. an den Ort der molekularen Erkennungsreaktionen, können besonders vorteilhaft parallel angeordnete interdigitale Ultramikroelektroden nach Figuren 2b, 2c, 2d oder 2g verwendet werden. Dabei werden in einer Ausführungsform des Verfahrens die beiden Ultramikroelektrodenpaare in Figuren 2b, 2c und 2d beispielsweise in der Weise zu einem elektrophoretischen System geschaltet, daß immer zwei zusammengehörige interdigitalen Fingerpaare oder Paare von bandförmigen Ultramikroelektroden einen Pol des elektrischen Feldes bilden. Je nach Polarisation und Ladung der Moleküle werden elektrophoretische Transportvorgänge eingeleitet. Verwendet man Felder mit niedriger Frequenz im unteren Hz und mHz-Bereich, werden wechselseitig Moleküle an die Elektroden herangeführt. Üblicherweise werden die elektrischen Felder in Sequenzen mit erzeugt. In den stromlosen Pausen können durch Elektrolyse gebildete Gase abdiffundieren und auch pH-Gradienten sich ausgleichen.

In einer anderen Ausführungsform werden die Hilfselektroden wie in Figuren 2e und 2f zur Applikation der vorstehend beschriebenen elektrischen Felder benutzt. Sie können dabei

WO 00/62047

CT/EP99/04883

42

die gleiche Polarisation aufweisen und gegen ein interdigitales Elektrodenpaar 3, 3' geschaltet werden, oder es wird das Feld zwischen den Hilfselektroden 3e und 3e' bzw. 3f und 3f' erzeugt, so daß die Moleküle in die Nähe der Detektionselektroden 3, 3' gezogen werden. Im Gegensatz zu den flächenhaften Hilfselektroden 3e und 3e' erlauben die Hilfselektroden 3f und 3f' durch die punktförmigen aktiven Elektrodenflächen mit Ultramikroelektrodencharakter eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche durch die verbesserte Diffusion. Auch durch die Elektrodenkonstruktion 3g und 3g' kann eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche als für 3 und 3' erreicht werden. Im Ergebnis dieser punktförmigen Strukturierung gibt sich durch hemispherische Diffusion der Vorteil, daß eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche erreicht werden kann, indem die aktive Elektrodenfläche verkleinert ist.

Diese Ausführungsform zur Heranführung von Analyt oder Reagenzmolekülen an die Elektrodenoberfläche wird ergänzt durch die gleichzeitige Verwendung der Detektions- und Hilfselektroden zur Erzeugung elektrischer Felder nach stattgefunder Erkennungsreaktion. Bei dieser Verfahrensweise werden die schon bei niedriger Spannung von typischerweise 1-10V entstehenden erheblichen Feldstärken zwischen den Elektroden dazu genutzt, daß schwächer gebundene Moleküle von ihrem Affinitätspartner im Unterschied zu stärker gebundenen Molekülen von den Detektionselektroden wieder entfernt werden können. Schon das einfache Ultramikroelektrodeninterdigitalpaar in 3, 3' in Figur 2c gestattet die Beseitigung schwächer und damit falsch gebundener Molekülkomplexe. Dazu wird das applizierte Feld zwischen Elektrode 3 und 3' als Wechselfeld mit niedriger Frequenz (wenige Hz oder mHz) benutzt, von beiden Elektroden unerwünschte Spezies zu entfernen. Das Wechselfeld mit niedriger Frequenz bewirkt dabei, daß immer die Elektrode, die gleich zur Ladung des

WO 00/62047

CT/EP99/04883

unewünschten Moleküls geladen ist, durch ihr hohes Feld die Abstoßung dieses Moleküles bewirkt. Durch die Wechselfelder werden beide Elektroden nacheinander in diesen abstoßenden Zustand versetzt und die Reaktion findet im Summenergebnis auf beiden Interdigitalsystemen statt. Die Feldapplikation wird nach kurzer Zeit, d.h. wenige zehntel bis Sekunden durch Pausen unterbrochen, in denen Gase und pH-verändernde Spezies abdiffundieren können. Die Reaktion kann durch biochemische Waschvorgänge oder durch Temperaturveränderung unterstützt werden. Eine Temperaturkontrolle kann sowohl extern als mit auf den Chips aufgebrachte Heizer aus Dünnfilmmetallbändern wie Platin realisiert werden.

Mit multiplen Ultramikroelektrodenanordnungen, wie in 2b, 2d, 2e, 2f und 2i, ist die Anwendung des Prozesses, wie für 2a beschrieben, für jedes Paar interdigitaler oder bandförmiger Ultramikroelektroden möglich. Prinzipiell kann dieser Prozeß durch Kombination beliebiger Detektor- und/oder Hilfselektroden mit dem gleichen Verfahren der niedrigfrequenten Feldumpolung und der Beseitigung schwachbindender bzw. unewünschter Moleküle von den Elektrodenoberflächen benutzt werden.

Als besondere Ausführung werden die in Figuren 2b, 2e, 2f und 2i außen liegenden Elektroden zur Felderzeugung verwendet, während die dazwischen liegenden Elektroden stromlos sind. Diese Art der Applikation kann auch zur Heranführung von Molekülen an die zwischenliegenden Elektrodenpaare benutzt werden, da sich diese in einer Art Feldkäfig befinden. Mit den gleichen multiplen Anordnungen sind überdies auch kombinierte Gleich- und Wechselstromapplikationen, Umpolungen sowie wahlweise Adressierung der Einzelelektroden möglich und damit gezielte Effekte der Molekülheranführung und der Molekülbeseitigung an beliebigen Elektroden zu erzielen.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

In den Ausführungsformen gemäß Figuren 2e und 2f lassen sich die flächenförmigen oder mit Punkten besetzten Hilfs-elektroden so einsetzen, daß jeweils zu einer oder beiden Ultramikroelektroden die gewünschte Polung der Elektroden zur Beseitigung von Molekülen vorliegt. Hier ist die Gleichstrom oder die niedrigfrequente Wechselstromapplikation über Kreuz, z.B. in Figur 2e zwischen 3e und 3', bzw. zwischen 3e' und 3 möglich. Damit lassen sich die Einzelelektroden selektiv behandeln. Die unterschiedliche Behandlung der Elektrodensysteme in 2b, 2d, 2e und 2f lässt sich in einer anderen Ausführung auch dazu verwenden, daß an einzelnen Elektroden unerwünschte Bindungen beseitigt werden und an anderen bestehen bleiben, so daß aus der Differenzmessung auf die Differenzmenge geschlossen werden kann.

An den kreisförmigen Elektroden gemäß Figur 2b oder spiralförmigen analogen Strukturen sind die vorstehend beschriebenen Verfahren zur Verwendung der elektrischen Felder dadurch besonders geeignet, daß durch eine zentrale Elektrode eine Art Feldkäfig über die dazwischen liegenden Elektroden gelegt werden kann, so daß diese auch im stromlosen Zustand von diesem Feld in gewünschter Weise von diesem Transport von Molekülen genutzt werden können.

Die punktförmigen Ultramikroelektrodenanordnungen in Figur 2h können in einer anderen Ausführungsform vorteilhaft zur Erzeugung elektrischer Felder sowohl zur Anreicherung von Molekülen als auch zur Entfernung von Molekülen eingesetzt werden. Dazu werden diese Elektroden an verschiedenen Stellen eines Sensorarrays z.B. als außen liegender Ring oder konzentriert in Innenposition oder durch Kombination von beiden ausgewählten Positionen eines Sensorarrays angeordnet. Sie dienen zur Erzeugung starker Felder an anderen Arraypositionen über den Raum des Sensorarrays

WO 00/62047

T/EP99/04883

45

hinweg durch besonders hohe Stromdichten. Die erzielbare hohe Stromdichte bei vergleichsweise niedrigen Spannungen erzeugt Felder, die den Transport von geladenen Molekülen nach elektrophoretischen Prinzipien besonders verbessern.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

46

## Ausführungsbeispiele

### Beispiel 1:

#### Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit direkter Kontaktableitung in Siliziumtechnologie

Mikroelektrodenstrukturen entsprechend Figuren 1 und 2a werden in Standardsilizium-technologie hergestellt. [K. Reimer et al. Sensors and actuators, A 46/47(1995)66]. Dazu wird 500 nm dickes thermisches Oxid auf 4"-Silizium-wafern erzeugt. Auf dem Oxid wird Fotolack photolithografisch so strukturiert, daß die Konturen der Elektroden für die Elektrodenstrukturen freiliegen. Das Ultramikro-elektrodensystem konzentrischer Ringe gemäß Details in Figur 2a besteht aus ringförmigen Elektrodenbändern mit 1,5 µm Breite im Ringabstand von 800 nm. Die Ringe sind abwechselnd über die Leiterbahnen 6 mit den Kontakten gemäß Figur 2a verbunden. Es sind 16 Sensorarraypositionen in einer 4 x 4 Matrix mit Arraypositionen von 300 µm Durchmesser auf dem Sensorarray angeordnet. Die 2 x 16 Ableitkontakte befinden sich auf zwei benachbarten Seiten des 1 x 1 cm großen Siliziumchips. Die Abstände der Sensorarraypositionen betragen 400 µm, so daß ein aktives Sensorarraygebiet von ca. 2,5 mm x 2,5 mm entsteht.

Durch 15 sec Tauchen in 10%ige Flußsäure wird das Oxid ca. 150 µm tief angeätzt. Eine 20 nm dicke Titanhaftschicht und eine 150 nm dicke Goldschicht werden auf die gesamte Oberfläche mittels Elektronenstrahl aufgedampft. Durch einen Lift off-Prozeß wird alles Metall bis auf Elektroden, Leiterbahnen und Kontakte beseitigt. Der Wafer wird anschließend mit einer 400nm dicken Silizium-oxinitrid-schicht bedeckt, die im Plasma durch chemische Abscheidung (PECVD-SiN<sub>x</sub>:H) erzeugt wird. Im folgenden werden die Array-positionen und den außenliegenden Kontaktflächen durch

WO 00/62047

CT/EP99/04883

47

reaktives chemisches Trockenätzen bis auf die Goldflächen freigelegt. Nach Aufschleudern eines Schutzlackes wird der Wafer von der Rückseite entsprechend der vorgesehenen Einzelchipkanten ca. 250 µm tief von der Rückseite eingesägt.

Beispiel 2:

Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit direkter Kontaktierung auf Glas

Auf 4"-Pyrexglaswafern werden mit einer dem Beispiel 1 entsprechenden Photolithographie Interdigitalelektrodenarrays entsprechend Figur 2e mit 9 Sensorpositionen im Raster 3 x 3 strukturiert. Dazu wird abweichend von Beispiel 1 auf das Glas eine 20 nm dicke Chromhaftschicht gefolgt von einer 150 nm dicken Platinschicht aufgedampft und wie im Ausführungsbeispiel 1 durch Lift-off-Technik fertig strukturiert. Als Haftvermittler für die folgende Isolationsschicht wird eine 3%ige Lösung von Alkyloxsilan in Aceton mit der Oberfläche in Kontakt gebracht. Die 400 µm großen Sensorarraypositionen im Abstand von 500 µm werden nach Aufschleudern einer 10µm dicken Polyimidschicht mit Standard-Photolithographie so strukturiert, daß die Kontaktflächen und die Sensorpositionen freigelegt werden. Das Interdigital-Elektroden-System mit Hilfselektroden entsprechend Figur 2e besteht an jedem Elektrodenfingersystem aus 90 je 200 µm langen und 1 µm breiten Fingern, wobei die Interdigitalabstände 0,9 µm betragen. Die Hilfselektroden 3e und 3e' sind wie in der Figur 2e dargestellt, bis 50 µm vom Rand der Sensorarrayposition flächig ausgeführt. Wie im Beispiel 1 wird der Wafer geschützt und eingesägt.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

Beispiel 3:Herstellung eines elektrischen Sensorarray-Systems mit CMOS-Schaltern;

Die Schalterebene wird mit einem CMOS-Standardprozess [D. Widmann, H. Mader, H. Friedrich, Technologie hochintegrierter Schaltungen, Springer Berlin 1996] in einem Prozeß mit 1 mm Minimalstrukturen hergestellt. Die nach Figur 3 erforderlichen Kreuzungen von Leiterbahnen werden durch Überkreuzungen von Polysilizium- und Aluminium-Bahnen realisiert. Der größere elektrische Widerstand spielt wegen der kleinen Sensorströme keine Rolle. Im verwendeten CMOS-Prozess werden die Schalter 12 und 13 vorteilhaft als Transmission-Gates ausführen. Jeweils ein Transmission-Gate verbindet die Punkte 12a in Abb. 3 und 4 mit der Leitung 18 bzw. den Punkt 13a mit der Bias-Leitung 21. Die Adress-Leitungen bestehen aus einem parallel laufenden Paar von Leiterbahnen, an denen Signale komplementärer Polarität zu den Gates der beiden Transistoren eines Transmission-Gates geführt werden. Bei der einen Polung ist das Transmission-Gate 12a-18 leitend und das Transmission-Gate 13a-21 sperrend. Bei der umgekehrten Polung ist 12a-18 sperrend und 13a-21 leitend. Die Transmission-Gates schalten sowohl positive als auch negative Ströme. Zusätzlich zu den üblichen Anschlußpads einer CMOS-Schaltung an den Rändern des Chips enthält die Schaltung nach Figur 3 an den Stellen 12a und 13a Aluminiumpads, mit denen die Verbindung zu den Elektroden-Arrays hergestellt wird. Standardmäßig wird der CMOS-Prozeß mit der Aufbringung einer PECVD-Nitridschicht und Öffnung der Anschluß-Pads in dieser passivierenden Schicht abgeschlossen. Auf diese Isolationsschicht werden mit gleicher Lift off-Technik, wie in Ausführungsbeispiel 1 dargestellt, Haftschicht und Goldelektroden direkt aufgedampft und wie oben beschrieben photolithographisch strukturiert. Eine weitere Passivierung ist nicht vor-

WO 00/62047

CT/EP99/04883

49

gesehen, da die Kontakte von den Interdigital- und Hilfs-elektroden direkt senkrecht in die darunterliegende Schalt-terebene geführt werden.

Beispiel 4:

Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit Schaltern, Verstärkern und Integrator in CMOS-Technologie

Für die Herstellung des Ausführungsbeispiels nach Figur 4 wird der gleiche CMOS-Standard-Prozess, sowie die gleiche Elektroden- und Leitungsanordnung benutzt, wie unter Beispiel 3 beschrieben wurde. In der 1 mm-Technologie werden diese Bauteile auf einer Fläche von 300 mm x 400 mm angeordnet. Zwischen den Elektroden und den Transmission-Gates, die zu den Meßleitungen 18, 19 führen, liegt jetzt ein Operationsverstärker und eine integrierte Kapazität von 1 pF, die den Ausgang mit dem Eingang des Operationsverstärker verbindet. Weiterhin liegt ein Schalter parallel zu dieser Kapazität. Von der Adressiereinheit 10 führen zusätzliche Steuerleitungen zu diesem Schalter, die ihn außerhalb der Meßzeiten geschlossen halten. In der beschriebenen Ausführung erzeugt ein Strom von 1 nA an den Elektroden am Ausgang des Operationsverstärkers nach 1 msec eine Spannung von 1 V. Diese Spannung wird wie in Beispiel 3 beschrieben mit Transmission-Gates auf die Meßleitungen 18, 19 geschaltet und mit dem Leseverstärker 11 gemessen.

Beispiel 5:

Aufbau von Mikrokompartmenten mit vorgefertigten Polymeren

Elektrische Sensorarrays, wie sie nach Beispiel 1 bis 4 hergestellt worden sind, werden mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und

WO 00/62047

CT/EP99/04883

50

Reinstwasser gewaschen. Im folgenden Schritt werden sie durch das Auflaminieren einer vorher perforierten 400 µm dicken Polypropylen-Folie mit Mikrokompartments versehen. Die Perforation entspricht dabei den Größen der Sensorarraypositionen und den Kontaktflächen an den Außenrändern. Das Auflaminieren geschieht mittels Heißsiegel-Technologie durch induktive Erwärmung. Die Justage der mittels eines Vakuumstempels in Wafergröße aufgebrachten Folie wird mittels Justiermarken auf der Waferoberfläche durch optische Kontrolle vorgenommen. Der auf -40° C gekühlte Wafer wird entlang der vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 6:

Aufbau von Mikrokompartments mit photolithographisch strukturierten Polymeren

Elektrische Sensorarrays, wie sie nach Beispiel 1-4 aufgebaut wurden, werden mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und Reinstwasser gewaschen. Anschließend werden sie im Spin coat-Verfahren mit Teflon AF (DuPont) mit einem 15 µm dicken Film beschichtet. Zuvor wird der gesamte Wafer mit dem zugehörigen Haftmittel (DuPont) benetzt. Nach Ausbacken der Teflonschicht bei 150° C für 20 Minuten werden mittels reaktivem Trockenätzen die Gebiete der Sensorpositionen und der Kontaktläden bis zu den metallischen Oberflächen freigelegt. Der Wafer wird entlang der vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 7:

Immobilisierung von Oligonukleotiden auf elektrischen

WO 00/62047

PT/EP99/04883

51

Sensorarrays

Ein nach Beispiel 5 hergestellter Chip mit 400 µm hohen polymeren Mikrokompartmenten wird auf einen Keramikträger mit üblichen Leiterbahnen montiert und drahtgebondet. Durch Aufkleben eines polymeren Formteils aus Polysiloxan entlang der Chipkanten, das die aktiven Elektrodengebiete eingrenzt, entsteht ein Reaktionsgefäß von ca. 5 mm Durchmesser auf den Chip. In dieses Reaktionsgefäß wird eine 5 mM Lösung von 11-Merkapto-undecanyl-amin in Cyclohexanon, eingefüllt, abgedeckt und bei Raumtemperatur für 5 Stunden belassen. Die Belegung der Elektroden durch Self-assembling wird kontrolliert durch eine online-Impedanz-Messung (EG&G Model 398). Die abnehmende Kapazität durch die Belegung mit der monomolekularen Molekülschicht und ist ein Maß für die Bedeckung. Die Belegung wird abgebrochen, wenn die ursprüngliche Kapazität der Chipelektroden um 70% abgesunken ist.

Diese Belegung der Metallocberflächen kann alternativ auch vor dem Brechen und Vereinzeln der Chips durch Tauchen des gesamten vorher entlackten Wafers in die analogen Lösungen vorgenommen werden.

Die nun mit Aminofunktionen derivatisierte Oberfläche des Chips wird anschließend mit einem Tropfen (0,1 - 10 µl) 20 mM Tolylen-2,4-diisocyanat (TDI) in Essigsäure-ethylester (EEE) bei RT während 10 - 60 min inkubiert. Es wird mit EEE gewaschen und getrocknet.

Nach Waschen eines so aktivierten Chips mit neutraler Phosphatpufferlösung werden mittels Mikrokapillardosierung nacheinander in jede Sensorarrayposition je 5nl 24mer-Oligonukleotid eingebracht, die am 5'-Terminus eine Jodoacetyl-Gruppe tragen.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

52

Die Nucleotidsequenz ist an jeder Arrayposition unterschiedlich entsprechend der zu analysierenden verschiedenen Ziel-DNA-Moleküle. Dabei sind die Volumina der Reaktionsflüssigkeiten kleiner als das Kompartimentvolumen. Die Kopplungsreaktion erfolgt spontan während einer Stunde bei Zimmertemperatur. Nach erfolgter kovalenter Anbindung wird das elektrische Sensorarray mit SSPE-Puffer (0,9 M NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5) gewaschen.

Beispiel 8:

Affinitätsbindung von DNA auf elektrischen Sensorarrays mit trägergebundenen Oligonukleotiden

Auf ein nach Beispiel 7 mit unterschiedlichen Fänger-oligonukleotiden beladenes elektrisches Sensorarray wird der Analyt als DNA - Gemisch aufgegeben. Es wird Analyt-DNA verwendet, in welche bei der konventionellen Vervielfältigung der DNA mittels PCR-Primern biotinylierte Reste eingeführt wurden. Die Analyt-DNA in SSPE-Puffer wird mit Denhardt's Lösung (0,5g Ficoll, 0,5g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g RSA in 0,5 l H<sub>2</sub>O) in eine Konzentration von 1 µg/ml überführt und auf das Sensorarray aufgegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird bei 40° C mit SSC-Puffer (52,6g NaCl, 26,5g Na-Citrat in 0,8l H<sub>2</sub>O) gewaschen.

Beispiel 9:

Immobilisierung von partikelgebundenen affinitätsbindenden Molekülen auf elektrischen Sensorarrays

Ein elektrisches Sensorarray, das nach Beispiel 1 hergestellt und nach Beispiel 5 mit Mikrokompartments versehen wurde, wird über einem üblichen Magneten zur Handhabung magnetischer Carrier plaziert. In jedes Mikro-

WO 00/62047

T/EP99/04883

53

kompartiment werden durch Mikrokapillardosierung 10nl Flüssigsuspensionen magnetischer Polymerkügelchen mit unterschiedlichen Oligonukleotiden in appliziert und durch die Magneten am Boden der Mikrokompartments über den Elektroden fixiert. Die Beladung der magnetischen Träger erfolgte zuvor separat auf allen Positionen nach einem Standardverfahren (Boehringer) durch Streptavidin/Biotin-Kopplung. Die Träger sind dabei oberflächlich mit Streptavidin beschichtet und binden die 5' -biotin-modifizierten 24mer-Nukleotide. Über die Streptavidin/Biotin-Bindung sind unterschiedliche Oligonukleotide fest auf den magnetischen Trägern immobilisiert.

Beispiel 10:

Detektion der Affinitätsbindung an Oberflächen von elektrischen Sensorarrays

Elektrische Sensorarrays mit immobilisierten Oligonukleotiden nach Beispiel 7 werden nach Hybridisierung analog Beispiel 8 zur Auslesung mittels Redox-Recycling vorbereitet. Dazu wird das gesamte elektrische Sensorarray mit 1,5 µl einer neutralen Phosphatpufferlösung des Markerenzymes alkalische Phosphatase, die als Streptavidinkonjugat vorliegt, befüllt. Die Biotin/Streptavidinbindung erfolgt während einer Stunde. Danach werden alle nicht gebundenen Enzymkonjugate mittels 2 mM p-Aminophenylphosphat in Phosphatpuffer pH 9,5 von der Sensoroberfläche weggespült. Nach Absaugen aller über die Mikrokompartments überstehenden Flüssigkeit wird die in jedem Mikrokompartiment durch die Enzymreaktion entstehende p-Aminophenolkonzentration, die der Menge doppelstranggebundener DNS adäquat ist, individuell mit einem 16-Kanal-Multipotentiotiostaten (Eigenbau) gemessen. Für das Redox-Recycling werden die Ultramikroelektroden paarweise mit 2 verschiedenen Potentialen beaufschlagt. Die Anode mit + 350 mV und

WO 00/62047

CT/EP99/04883

54

die Kathode mit - 100 mV gegen eine Silber/Silberchlorid - Referenzelektrode. Der anodische und der kathodische Strom jeder Arrayposition wird als Stromanstieg dI/dT an der jeweiligen Sensorposition ausgewertet. Man erhält einen Stromanstieg von 0,5 bis 2 nA pro Minute je nach Beladungsdichte. Die Summe beider Ströme ist ein quantitatives Maß für die Anzahl gebundener Ziel-DNA an jeder Arrayposition.

Die Menge gebundener DNA pro Arrayposition wird dadurch bestimmt, daß eine Arrayposition des Sensorarray als interner Standard benutzt wird. Dazu wird dem Analyten ein 35mer-Oligonucleotid, welches 20 komplementäre Basen zu dem Fängeroligonucleotid an einer Arrayposition aufweist in bekannter Konzentration quantitativ beigemischt.

Beispiel 11:

Detektion der Affinitätsbindung auf Oberflächen von elektrischen Sensorarrays mittels Impedanzspektroskopie

Elektrische Sensorarrays, die nach Beispiel 6 aufgebaut werden, werden an jeder Sensorarrayposition mit 10nl Oligonukleotidlösung in einer Konzentration von 10 µg pro ml Phosphatpuffer pH 7 befüllt. Die 24-mer-Oligonukleotide besitzen einheitlich 6 Thymidin-Reste am 5'-Kettenende, deren letzte 3 mit Thiolat-Gruppen modifiziert sind. Nach 12 Stunden ist die Schwefel/Gold-Bindung der Thiolatgruppen beendet.

Bei Raumtemperatur wird jede Arrayposition mittels Impedanzspektroskopie (EG&G Model 392) in einem Frequenzbereich zwischen 10mHz und 1MHz vermessen und die komplexe Impedanz analysiert.

Das Sensorarrays wird mit SSPE-Puffer (0,9M NaCl, 50mM

WO 00/62047

CT/EP99/04883

55

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5) gewaschen. Die Analyt-DNA in SSPE-Puffer wird mit Denhardt's Lösung (0,5g Ficoll, 0,5g Polyvinylpyrrolidon, 0,5g RSA in 0,5l H<sub>2</sub>O) in eine Konzentration von 1µg/ml überführt und auf das Sensorarray aufgegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird bei 40°C Mit SSC-Puffer (52,6g NaCl, 26,5g Na-Citrat in 0,8l H<sub>2</sub>O) gewaschen.

Bei Raumtemperatur wird jede Arrayposition mittels Impedanzspektroskopie in einem Frequenzbereich zwischen 10mHz und 1MHz erneut vermessen und die komplexe Impedanz analysiert.

Die Differenz der Messungen an jeder Sensorarray-Position vor und nach DNA-Bindung zeigt im Falle der Erniedrigung des elektrischen Leitfähigkeitstherms der komplexen Impedanz die Position mit erfolgter DNA-Bindung an.

Beispiel 12:

Transport geladener Moleküle zu Detektorelektroden des elektrischen Sensorarrays

Die Analyt-DNA in 200 mmol/l Bernsteinsäurepuffer-Puffer pH 5,1 wird mit einer Konzentration von ca. 1 µg/ml auf das Sensorarray aufgegeben.

Mit Hilfe einer externer Präzisionsstromquelle (Eigenbau) wird auf alle Elektroden 3e' und 3 ein Strom von 20 nA für 80 msec aufgeprägt. Danach wird für 80 msec auf die Elektroden 3e und 3' umgeschaltet. Die Elektroden 3 und 3' sind dabei positiv gepolt. Die gesamte Schaltsequenz wird 100 mal wiederholt. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird dann bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6g NaCl, 26,5g Na-Citrat in 0,8l H<sub>2</sub>O) gewaschen.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

56

Beispiel 13:

Elektrische Stringenzbehandlung von hybridisierter DNA auf elektrischen Sensorarrays

Ein elektrisches Sensorarray mit hybridisierter DNA, wie im Beispiel 12 verwendet, wird mit einer 200 mmol/l Bernstein-säurepuffer-Puffer pH 5,1 beaufschlagt.

Mittels einer externen Stromquelle (Eigenbau) wird 10nA Wechselstrom von 50 Hz Strom für 0,2sec auf alle Elektrodenpaare 3, 3' aufgeprägt. Nach einer Pause von 0,2sec wird die gesamte Schaltsequenz 100 mal wiederholt. Abdiffundierte schwächer gebundene Moleküle werden dann bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6g NaCl, 26,5g Na-Citrat in 0,8l H<sub>2</sub>O) weggewaschen.

Beispiel 14:

Selektive Desorption von oberflächengebundenen Molekülen auf elektrischen Sensorarraychips

Ein elektrisches Sensorarray wird nach Beispiel 1 hergestellt und nach Beispiel 7 mit Oligonukleotiden beladen. Dazu werden Elektrodengeometrien an den Sensorarraypositionen gemäß Figur 2e verwendet. In den Probenring wird Glycinpuffer pH 5,1 eingefüllt.

Alle Elektroden 3 und 3' auf dem Sensorarray werden an eine Stromquelle (Eigenbau) angeschlossen. Nun wird Wechselstrom mit 20 Hz und einer Spannung von 2V für eine Sekunde angelegt und nach einer Pause von 0,5 Sekunden erneut eingeschaltet. Diese Sequenz wird 50 mal wiederholt. Anschließend wird das elektrische Sensorarray mit SSPE-Puffer (0,9M NaCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5)

WO 00/62047

CT/EP99/04883

57

gewaschen.

Die folgende Hybridisierung von Analyt-DNA erfolgt nur noch auf fängerbeladenen Elektroden 3e, 3e' und wird analog Beispiel 8 ausgeführt.

Wie in Beispiel 10 wird mit alkalischer Phosphatase markiert. Mittels Redox-Recycling messen die Elektroden 3 und 3' die p-Aminophenolkonzentration die auf den Flächen 3e, 3e' produziert wird. Dabei wird der Stromanstieg  $dI/dT$  an der jeweiligen Sensorposition ausgewertet. Man erhält einen Stromanstieg von 0.2 bis 2 nA pro Minute je nach Beladungsdichte.

Beispiel 15:

Kontrolle und Meßwerterfassung eines elektrischen Sensorarrays mittels eines ASIC

Ein elektrisches Sensorarray wird analog Beispiel 1, 7, 8 hergestellt, mit Oligonukleotidfängern beladen und zur Affinitätsbindung von Ziel-DNA sowie folgender Enzymmarkierung wie Beispiel 10 verwendet. An die 32 Leitungen 6 des Sensorarrays wird ein selbstentwickelter ASIC zur seriellen Elektrodensteuerung mit 32 Schaltausgängen angeschlossen und mit einem Bipotentiostaten verbunden. Die Vorbereitung und Realisierung des Redox-Recycling werden wie nach Beispiel 10 ausgeführt. Die anodischen Potentiale von +350 mV und die kathodischen Potentiale von -100 mV werden vom Bipotentiostaten an den ASIC angelegt und über die direkten Leiterbahnen zu den einzelnen Sensorarraypositionen geleitet. Dabei ist jede Sensorarrayposition einem Schaltersystem auf dem ASIC zugeordnet. Prozessor-kontrolliert wird nun nacheinander durch den Bipotentiostaten jede Sensorarrayposition für 0,1sec ausgelesen. Beim Umschalten einer Arrayposition von Lese- in Nichtlesezustand

WO 00/62047

CT/EP99/04883

58

wird mittels ASIC das anodische und das kathodische Potential auf die jeweilige Kontaktleitung geschaltet. Alle 16 Arraypositionen arbeiten dadurch kontinuierlich im Redox-Recycling. Dieser serielle Auslesezyklus wird 5min ausgeführt. Der Anstieg des Summenstroms pro Zeit je Arrayposition wird gemessen und wie in Beispiel 10 interpretiert.

Beispiel 16:

Kontrolle und Meß erfassung eines elektrischen Sensorarrays mit teilintegrierter Elektronik

Die Adressleitungen 14, 15, 16, 17 des Sensorarrays wie in Figur 3 gezeigt werden mit einem PC-gesteuerten Decoder (Eigenbau) verbunden. An je eine der Leseleitungen 18, 19 wird ein Kanal eines 8-kanaliger Multipotentiostaten angeschlossen. Die Biasleitungen 20, 21 werden mit analogem anodischen (+350mV) und dem kathodischen Potential (-100mV) wie in Beispiel 15 versorgt.

Die Vorbereitung und Realisierung des Redox-Recycling werden wie nach Beispiel 10 ausgeführt.

Im Lesezustand werden alle Arraypositionen entlang der Adressleitung 14 bzw. 15 aktiviert und durch die integrierten Schalter 12 an die jeweiligen Meßkanäle des Multipotentiostaten geschaltet. Alle anderen Arraypositionen sind im Nichtlesezustand und durch die integrierten Schalter 13 mit den Biasleitungen 20 bzw. 21 verbunden, so daß auch hier die entsprechenden Potentiale an 3 bzw. 3' anliegen und die Redoxreaktion kontinuierlich abläuft.

Prozessorkontrolliert wird nun parallel durch den Multipotentiostaten jede aktive Sensorarrayposition für 0,1sec ausgelesen. Danach wird durch den Decoder diese

WO 00/62047

CT/EP99/04883

59

Reihe mit Schalter 12 in den Nichtlesezustand versetzt und sofort die nächste Reihe mittels der nächstliegenden Adressleitungen über 13 aktiviert.

Dieser Auslesezyklus wird ca. 5 Minuten ausgeführt. Der Anstieg des Stroms pro Zeit wird für jede Sensorarray-position separat gemessen und im PC gespeichert. Die Auswertung entspricht Beispiel 15.

Beispiel 17:

Kontrolle und Meßwerterfassung eines elektrischen Sensor-arrays mit integriertem Zwischenspeicher

Ein elektrisches Sensorarray wird gemäß Beispiel 4 und 5 hergestellt mit Elektrodengeometrien, die der Figur 2c entsprechen. Die Vorbereitung des elektrischen Sensorarrays mit chemischen Komponenten erfolgt analog Beispiel 15.

Die Adressleitungen 14, 15, 16, 17 des Sensorarrays wie in Figur 4 gezeigt werden mit einem PC-gesteuerten Decoder (Eigenbau) verbunden analog Beispiel 15. An jede der Leseleitungen 18, 19 wird ein hochempfindlicher Verstärker mit dem Ausgang an einen ADC angeschlossen. Die Biasleitungen 20, 21 werden mit analogem anodischen (+350mV) und dem kathodischen Potential (-100mV) aus einem Bipotentiostaten versorgt. Die Adressierung erfolgt wie im Beispiel 16.

Abweichend von diesem Beispiel wird nur der im Nichtlesezustand an den Elektroden 3 und 3' durch Redox-Recycling generierte Strom durch einen integrierten Vorverstärker mit internem Integrator 22, 23 für jede Elektrode einzeln gespeichert. Beim Lesevorgang wird bei Adressierung nur der Inhalt dieses Integrators abgefragt.

Das dort ablaufende Redox Recycling generiert Strom, der

WO 00/62047

CT/EP99/04883

60

— über den internen Verstärker in 23 zum internen positionsspezifischen Integrator in 23 geleitet und dort aufsummiert wird. Die Aufsummation geschieht während des gesamten Nichtlesezustandes.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

Patentansprüche

1. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle, gekennzeichnet durch die folgenden Merkmale:
  - Anordnung von mehr als 2 Sensorpositionen auf planaren Trägern bestehend aus lokal separierten mindestens paarweise angeordneten Arrays von Ultramikroelektroden und wahlweise angeordneten Hilfselektroden;
  - individuelle elektrische Adressierung jeder Sensorposition;
  - kontinuierliche elektrochemische Kontrolle an jeder Sensorposition;
  - wahlweise Erzeugung elektrischer Gleich- und/oder Wechselfelder auf jeder Sensorposition;
  - individuelle Detektion unterschiedlicher elektrochemischer Reaktionen oder Eigenschaften bzw. elektrische Auslesung solcher vorangegangenen Ereignisse an jeder Sensorposition;
  - Immobilisierung unterschiedlicher oder gleicher affinitätsbindender Moleküle wahlweise auf den Sensorpositionen oder an partikulären Trägern oder in Gelen über den Sensorpositionen unabhängig von optischen Eigenschaften;
2. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport

WO 00/62047

CT/EP99/04883

geladener Moleküle nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß der planare Träger aus Silizium, Glas, Keramik oder Kunststoff besteht.

3. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 2 dadurch gekennzeichnet, daß Ultramikro- und Hilfselektrodenoberflächen aus Edelmetallfilmen wie Gold oder Platin oder Iridium oder aus Kohlenstoff bestehen.
4. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß Ultramikro- und Hilfselektrodenoberflächen aus unterschiedlichen Materialien bestehen können.
5. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß jede einzelne Sensorposition auch mit einem oder mehreren Ultramikroelektrodenpaaren gleicher oder verschiedener Geometrie bestückt ist.
6. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß die paarweise angeordneten Ultramikroelektroden als interdigitale Fingerelektroden oder als mit punktförmigen Ultramikroelektroden bedeckte Flächen oder Interdigitalanordnungen oder spiral- oder kreisförmig angeordnete Bandstrukturen angeordnet sind.

WO 00/62047

CT/EP99/04883

7. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß die paarweise angeordneten Ultramikroelektroden nach Anspruch 6 wahlweise auch mehrschichtig als von Isolatorschichten getrennte bandförmige Metallfilme vertikal gestapelt werden.
8. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß an jeder einzelnen Sensorposition neben den Ultramikroelektroden wahlweise zusätzlich weitere flächige oder strukturierte Elektroden, die kein Ultramikroelektrodenverhalten aufweisen müssen und/oder unkontaktierte metallische Flächen angeordnet werden.
9. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorpositionen von Flüssigkeiten bedeckt sind und Reagenzien, Analyte oder Analytgemische jeder einzelnen Sensorposition oder allen Sensorpositionen gleichzeitig zugeführt werden.
10. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 9 dadurch gekennzeichnet, daß an den einzelnen Sensorpositionen affinitätsbindende Moleküle auch mit unterschiedlicher Spezifität auf den einzelnen Elektroden und/oder auf metallischen Hilfsflächen und/oder auf Flächen des Trägers und/oder

WO 00/62047

CT/EP99/04883

- Kompartimentwandungen so immobilisiert sind, daß voltametrische oder impedimetrische Meßverfahren mit den Ultramikroelektroden ausgeführt werden.
11. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß an den einzelnen Sensorpositionen affinitätsbindende Moleküle, die auf den Ultramikroelektroden gebunden wurden, durch Desorption oder elektrochemische Oxidation wieder entfernt werden.
  12. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 11 dadurch gekennzeichnet, daß eine voltametrische Detektion in flüssigen Analyten unabhängig von partikulären Bestandteilen und/oder aufliegenden Gelen und/oder anhaftenden Substanzen vorgenommen wird.
  13. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 12 dadurch gekennzeichnet, daß eine impedimetrische Detektion in flüssigen Analyten unabhängig von schwebenden partikulären Bestandteilen vorgenommen werden kann.
  14. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß an jeder Sensorposition individuelle molekulare Bindungsereignisse elektrochemisch detektiert werden, nachdem Analyte aus Stoffgemischen an die auf oder über den Sensorpo-

WO 00/62047

CT/EP99/04883

sitionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle spezifisch gebunden worden sind.

15. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß an jeder Sensorposition individuell das Ausbleiben molekularer Bindungsereignisse detektiert wird, nachdem Analyte aus Stoffgemischen mit den auf oder über den Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Molekülen keine spezifische Bindung eingegangen sind.
16. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß an jeder Sensorposition individuelle molekulare Bindungsereignisse nach Bindung von Analyten aus Stoffgemischen an die auf oder über den Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle dadurch mit den Ultramikroelektroden detektiert werden, daß redoxaktive Reaktionsprodukte bindungsspezifisch eingebrachter Enzymmarker qualitativ und/oder quantitativ erfaßt werden.
17. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 16 dadurch gekennzeichnet, daß die Ultramikroelektroden und gegebenenfalls zusätzliche Elektroden an jeder einzelnen Sensorposition mittels elektronischer Schaltungen so adressiert und elektrochemische Ereignisse so ausgelesen werden, daß Potentiale zur Polarisation der Elektroden ohne Unterbrechung bestehen bleiben und eine elektrische Doppelschicht an

WO 00/62047

CT/EP99/04883

- den flüssigkeitsbenetzten Elektroden nicht beeinflußt wird.
18. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays gleichzeitig geeignet zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 17 dadurch gekennzeichnet, daß integrierte Schaltungen für das Analyseverfahren im aus Silizium bestehenden planaren Träger hergestellt werden.
  19. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 18 dadurch gekennzeichnet, daß bei serieller Auslesung des Arrays elektrochemische Vorgänge, die an den Ultramikroelektroden und gegebenenfalls zusätzlichen Elektroden an jeder einzelnen Sensorposition in der Zeit zwischen individuellen Auslesevorgängen ablaufen, individuell erfaßt und gespeichert und/oder aufsummiert werden.
  20. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 19 dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Sensorpositionen durch volumenseparierende Kompartimente so abgetrennt sind oder mechanisch abgetrennt werden können, daß eine positionsspezifische quantitative elektrochemische Detektion möglich ist.
  21. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß Ultramikroelektroden aus Edelmetall und wahlweise weitere flächige oder strukturierte Elektroden und/oder unkontaktierte

WO 00/62047

CT/EP99/04883

- metallische Flächen gleichzeitig als Immobili-  
sierungsflächen für Selfassembling-Monoschichten  
unterschiedlicher thiolmodifizierter affinitäts-  
bindender Moleküle auf den verschiedenen Sensor-  
positionen genutzt werden.
22. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausbildung von Selfassembling-Monoschichten so ausgeführt wird, daß auf allen Sensorpositionen eine gleichartige Beschichtung mit bifunktionellen thiolmodifizierten Molekülen vorgenommen wird, die in einem zweiten Reaktionsschritt zur Bindung gleicher oder unterschiedlicher affinitätsbindender Moleküle auf jeder einzelnen Sensorposition genutzt werden.
23. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Anspruch 20 und 21 an den einzelnen Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle mit einer Schicht aus Hydrogelen belegt werden, die wahlweise auch das gesamte elektrische Sensorarray bedecken kann.
24. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß in die Kompartimente an den einzelnen Sensorpositionen unterschiedliche affinitätsbindende Moleküle, die an Polymere oder an Nanopartikel aus Metallen oder mineralischen Stoffen oder in gelartigen Substanzen trägergebunden sind, eingebracht und fixiert werden.

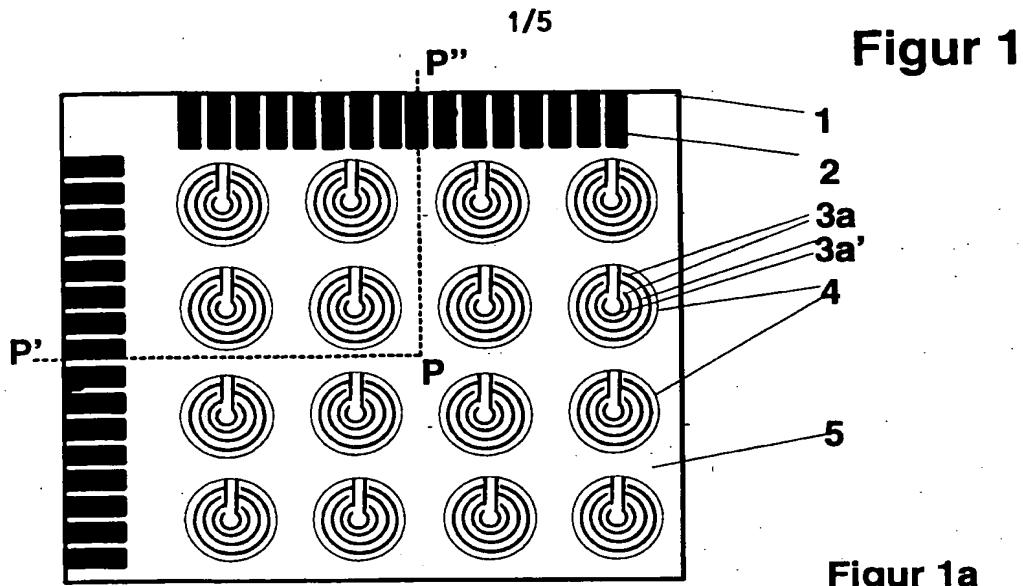
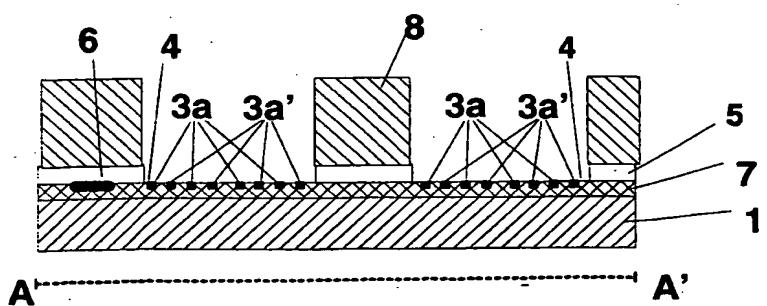
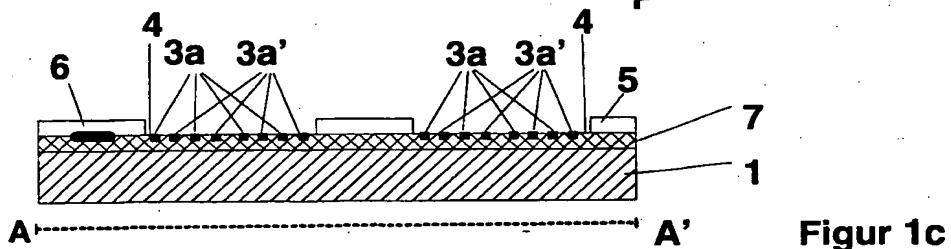
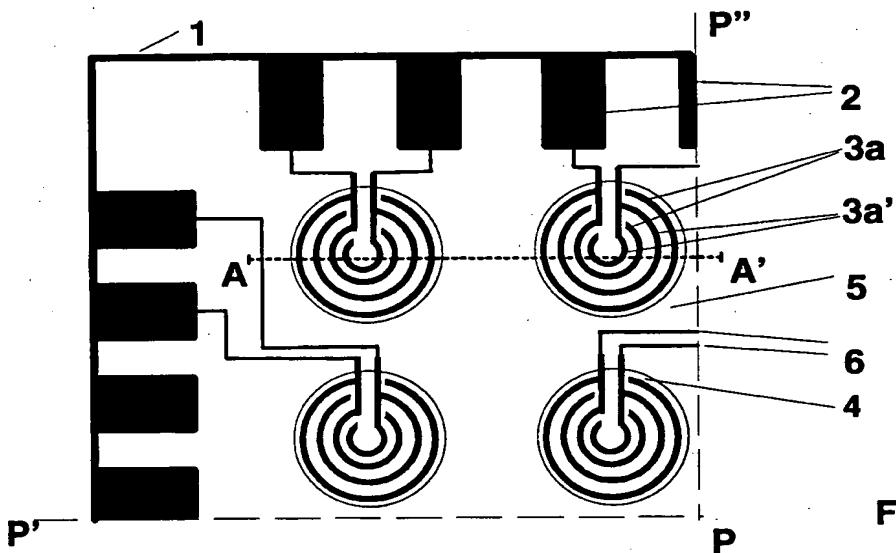
WO 00/62047

CT/EP99/04883

25. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die an einzelnen Sensorpositionen eingebrachten und an partikulären Trägern immobilisierten affinitätsbindender Moleküle zusätzlich in einer Schicht aus Hydrogelen fixiert werden, die wahlweise auch das gesamte elektrische Sensorarray bedecken kann.
26. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 25 dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Ultramikroelektrodenpaaren der verschiedenen Positionen des elektrischen Sensorarrays, wahlweise unter Einbeziehung der Hilfselektroden des Sensorarrays, solche elektrischen Felder erzeugt werden, daß geladene Moleküle nach elektrophoretischen Prinzipien bewegt werden.
27. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 26 dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Ultramikroelektrodenpaaren der verschiedenen Positionen des elektrischen Sensorarrays, wahlweise unter Einbeziehung der Hilfselektroden des Sensorarrays, solche elektrischen Wechselfelder erzeugt werden, daß gebundene Analytmoleküle abhängig von Bindungsstärke und Ladung von den einzelnen Sensorpositionen entfernt werden.

WO 00/62047

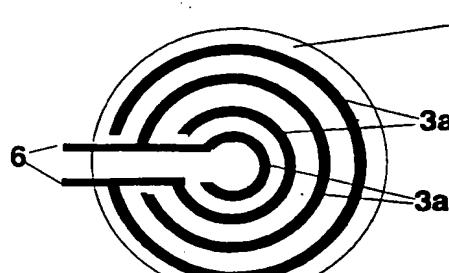
CT/EP99/04883

**Figur 1a**

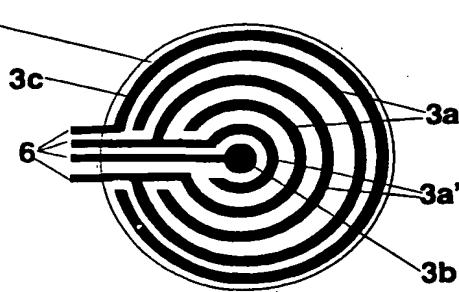
WO 00/62047

CT/EP99/04883

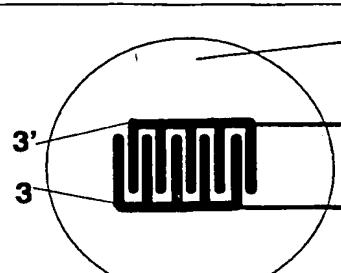
2/5



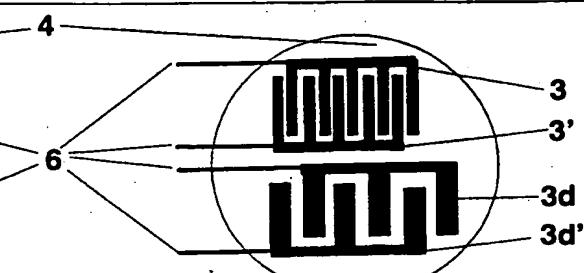
Figur 2a



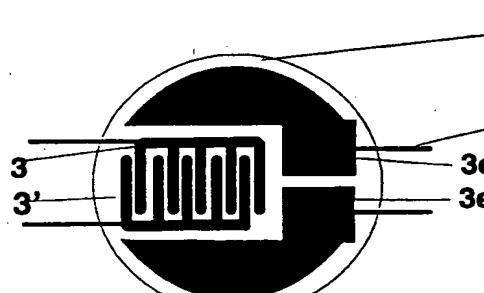
Figur 2b



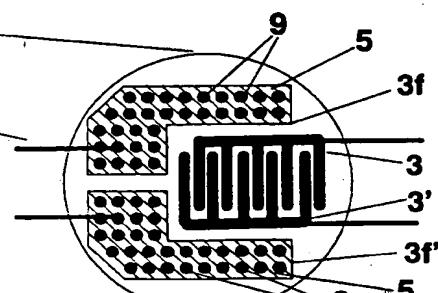
Figur 2c



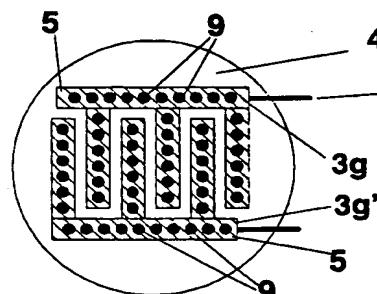
Figur 2d



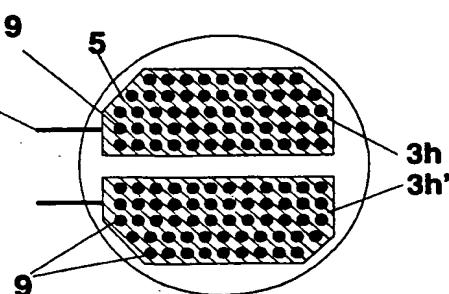
Figur 2e



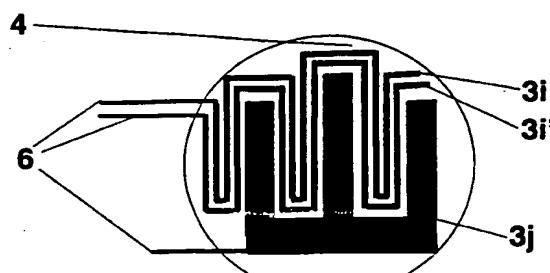
Figur 2f



Figur 2g



Figur 2h



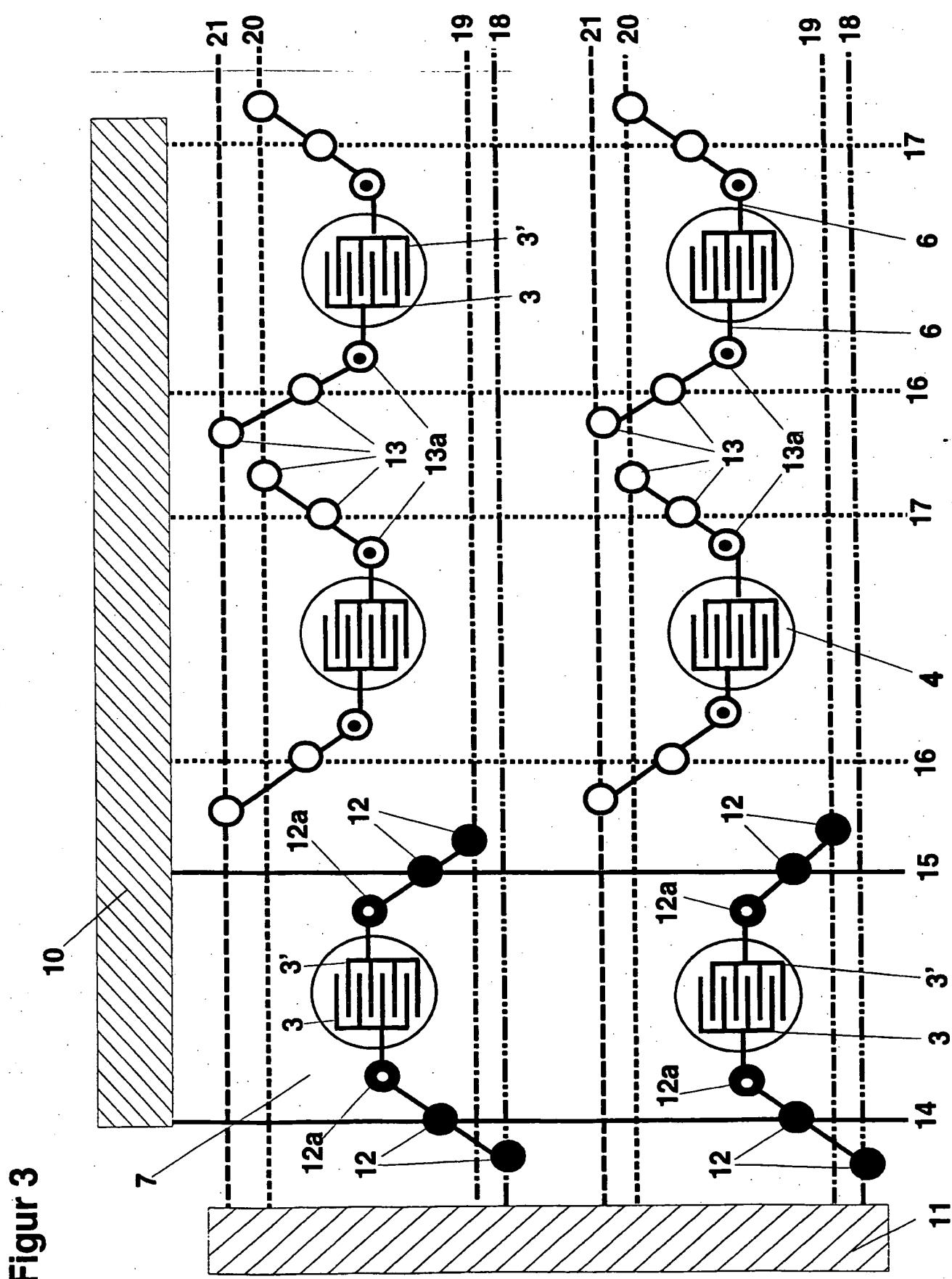
Figur 2i

**Figur 2**

WO 00/62047

CT/EP99/04883

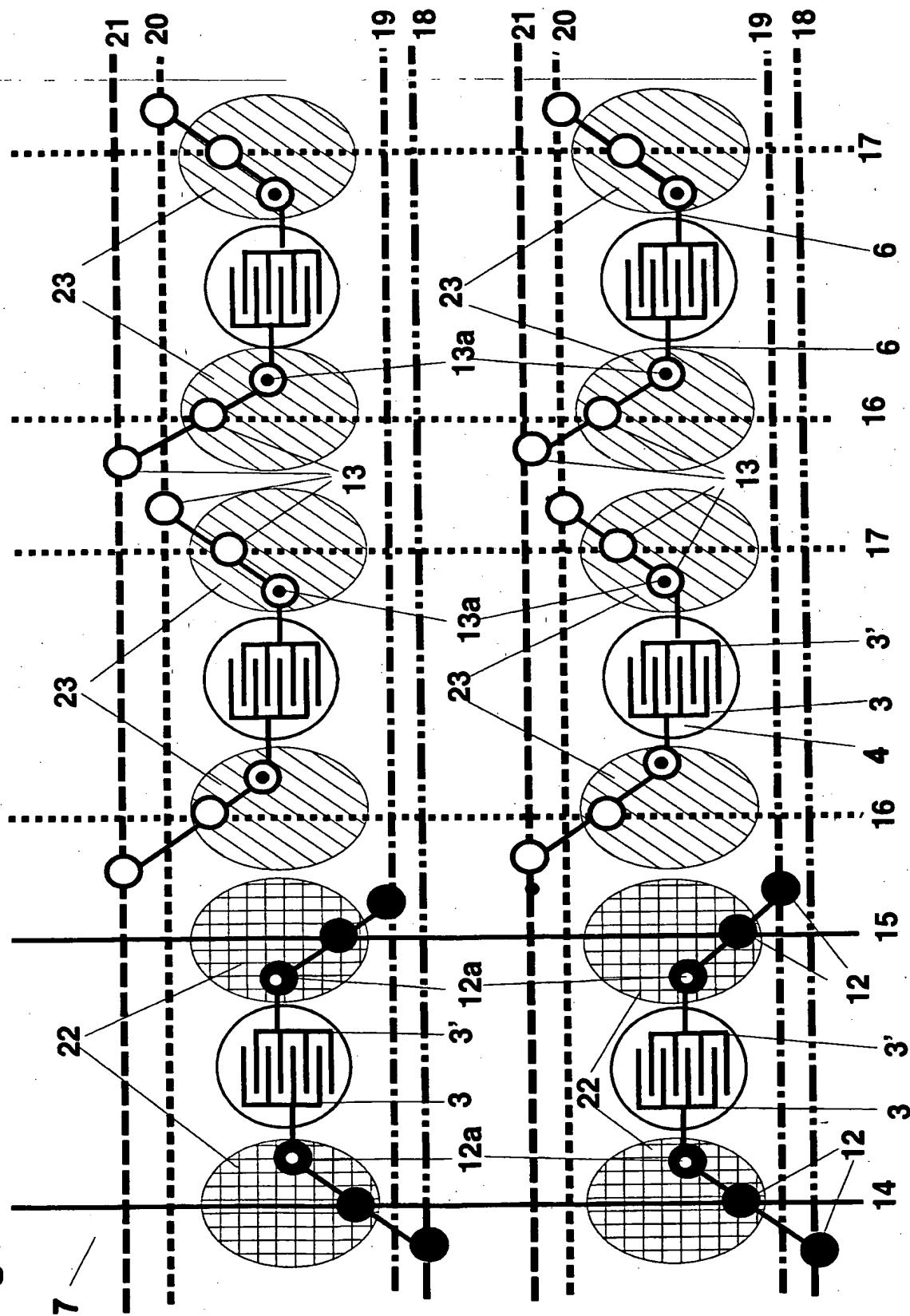
3/5



WO 00/62047

4/5

CT/EP99/04883

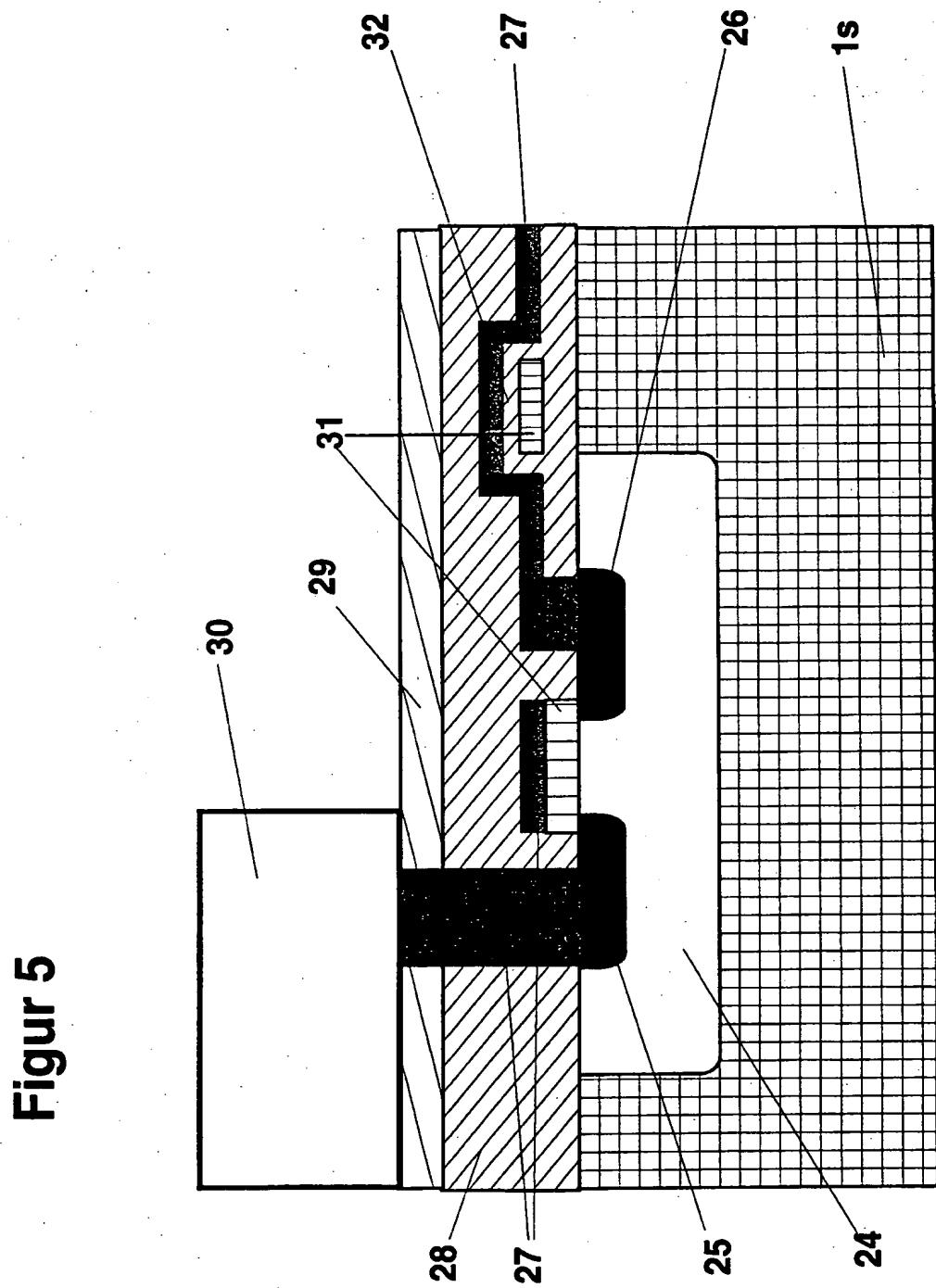


**Figur 4**

WO 00/62047

PCT/EP99/04883

5/5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/04883

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N27/403

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| Y        | US 5 120 421 A (GLASS ROBERT S ET AL)<br>9 June 1992 (1992-06-09)<br>abstract; figure 12<br>---                                       | 1                     |
| Y        | WO 95 26500 A (NEOTRONICS LTD ;IREDALE<br>PETER JULIAN (GB))<br>5 October 1995 (1995-10-05)<br>abstract; figure 3<br>---              | 1                     |
| A        | WO 98 01758 A (NANOGEN INC)<br>15 January 1998 (1998-01-15)<br>abstract; figures 3,4<br>---   | 1                     |
| A        | DE 42 36 421 A (AHLERS HORST DR ING HABIL<br>;CHRIST ERICH DR SC TECHN (DE))<br>11 May 1994 (1994-05-11)<br>abstract; figure 1<br>--- | 1                     |
|          | -/-   |                       |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

6 January 2000

13/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International Application No<br>PCT/EP 99/04883 |
|---|

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A        | WO 96 33403 A (HIGSON SEAMUS PATRICK JOHN ;UNIV MANCHESTER METROPOLITAN (GB))<br>24 October 1996 (1996-10-24)<br>abstract<br>--- | 1                     |
| A        | EP 0 455 508 A (GEN ELECTRIC CO PLC)<br>6 November 1991 (1991-11-06)<br>abstract; figure 1<br>---                                | 1                     |
| A        | WO 90 12314 A (URBAN GERALD ;NAUER GERHARD (AT)) 18 October 1990 (1990-10-18)<br>abstract; figures 1-7<br>-----                  | 1                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04883

| Patent document cited in search report |   | Publication date |    | Patent family member(s) |  | Publication date |
|--|---|------------------|----|-------------------------|--|------------------|
| US 5120421                             | A | 09-06-1992       | US | 5296125 A               |  | 22-03-1994       |
| WO 9526500                             | A | 05-10-1995       | AU | 2077195 A               |  | 17-10-1995       |
|  |   |                  | CA | 2186341 A               |  | 05-10-1995       |
|  |   |                  | EP | 0753141 A               |  | 15-01-1997       |
| WO 9801758                             | A | 15-01-1998       | US | 5965452 A               |  | 12-10-1999       |
|  |   |                  | AU | 3717697 A               |  | 02-02-1998       |
|  |   |                  | CA | 2259406 A               |  | 15-01-1998       |
|  |   |                  | EP | 0920624 A               |  | 09-06-1999       |
| DE 4236421                             | A | 11-05-1994       |    | NONE                    |  |                  |
| WO 9633403                             | A | 24-10-1996       | AU | 698852 B                |  | 12-11-1998       |
|  |   |                  | AU | 5340296 A               |  | 07-11-1996       |
|  |   |                  | EP | 0823050 A               |  | 11-02-1998       |
|  |   |                  | JP | 11504708 T              |  | 27-04-1999       |
| EP 0455508                             | A | 06-11-1991       | GB | 2244135 A               |  | 20-11-1991       |
|  |   |                  | JP | 4230851 A               |  | 19-08-1992       |
|  |   |                  | US | 5194133 A               |  | 16-03-1993       |
| WO 9012314                             | A | 18-10-1990       | AT | 403528 B                |  | 25-03-1998       |
|  |   |                  | AT | 78389 A                 |  | 15-07-1997       |
|  |   |                  | AU | 5348790 A               |  | 05-11-1990       |
|  |   |                  | DD | 301930 A                |  | 21-07-1994       |
|  |   |                  | EP | 0418359 A               |  | 27-03-1991       |
|  |   |                  | JP | 3505785 T               |  | 12-12-1991       |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/04883

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 GO1N27/403

**Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK**

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

**Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )**  
**IPK 7 GO1N**

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

#### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| Y          | US 5 120 421 A (GLASS ROBERT S ET AL)<br>9. Juni 1992 (1992-06-09)<br>Zusammenfassung; Abbildung 12<br>---                                       | 1                  |
| Y          | WO 95 26500 A (NEOTRONICS LTD ;IREDALE<br>PETER JULIAN (GB))<br>5. Oktober 1995 (1995-10-05)<br>Zusammenfassung; Abbildung 3<br>---              | 1                  |
| A          | WO 98 01758 A (NANOGEN INC)<br>15. Januar 1998 (1998-01-15)<br>Zusammenfassung; Abbildungen 3,4<br>---   | 1                  |
| A          | DE 42 36 421 A (AHLERS HORST DR ING HABIL<br>;CHRIST ERICH DR SC TECHN (DE))<br>11. Mai 1994 (1994-05-11)<br>Zusammenfassung; Abbildung 1<br>--- | 1                  |
|            | -/--   |                    |

**X** Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

**X** Siehe Anhang Patentfamilie

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
  - "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
  - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
  - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
  - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
  - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
  - "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
  - "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
  - "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

**Datum des Abschlusses der internationalen Recherche**

### **Absendedatum des internationalen Recherchenberichts**

6. Januar 2000

13/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

**Bevollmächtigter Bediensteter**

Duchatellier, M

## INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/04883

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A          | WO 96 33403 A (HIGSON SEAMUS PATRICK JOHN ;UNIV MANCHESTER METROPOLITAN (GB))<br>24. Oktober 1996 (1996-10-24)<br>Zusammenfassung<br>---- | 1                  |
| A          | EP 0 455 508 A (GEN ELECTRIC CO PLC)<br>6. November 1991 (1991-11-06)<br>Zusammenfassung; Abbildung 1<br>----                             | 1                  |
| A          | WO 90 12314 A (URBAN GERALD ;NAUER GERHARD (AT)) 18. Oktober 1990 (1990-10-18)<br>Zusammenfassung; Abbildungen 1-7<br>-----               | 1                  |

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04883

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument |   | Datum der<br>Veröffentlichung |    | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie |  | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|----|-----------------------------------|--|-------------------------------|
| US 5120421   | A | 09-06-1992                    | US | 5296125 A                         |  | 22-03-1994                    |
| WO 9526500   | A | 05-10-1995                    | AU | 2077195 A                         |  | 17-10-1995                    |
|  |   |                               | CA | 2186341 A                         |  | 05-10-1995                    |
|  |   |                               | EP | 0753141 A                         |  | 15-01-1997                    |
| WO 9801758   | A | 15-01-1998                    | US | 5965452 A                         |  | 12-10-1999                    |
|  |   |                               | AU | 3717697 A                         |  | 02-02-1998                    |
|  |   |                               | CA | 2259406 A                         |  | 15-01-1998                    |
|  |   |                               | EP | 0920624 A                         |  | 09-06-1999                    |
| DE 4236421   | A | 11-05-1994                    |    | KEINE                             |  |                               |
| WO 9633403   | A | 24-10-1996                    | AU | 698852 B                          |  | 12-11-1998                    |
|  |   |                               | AU | 5340296 A                         |  | 07-11-1996                    |
|  |   |                               | EP | 0823050 A                         |  | 11-02-1998                    |
|  |   |                               | JP | 11504708 T                        |  | 27-04-1999                    |
| EP 0455508   | A | 06-11-1991                    | GB | 2244135 A                         |  | 20-11-1991                    |
|  |   |                               | JP | 4230851 A                         |  | 19-08-1992                    |
|  |   |                               | US | 5194133 A                         |  | 16-03-1993                    |
| WO 9012314   | A | 18-10-1990                    | AT | 403528 B                          |  | 25-03-1998                    |
|  |   |                               | AT | 78389 A                           |  | 15-07-1997                    |
|  |   |                               | AU | 5348790 A                         |  | 05-11-1990                    |
|  |   |                               | DD | 301930 A                          |  | 21-07-1994                    |
|  |   |                               | EP | 0418359 A                         |  | 27-03-1991                    |
|  |   |                               | JP | 3505785 T                         |  | 12-12-1991                    |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**